



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE TVORBY
POLYELEKTROLYTOVÝCH KOMPLEXŮ V SYSTÉMU
DEXTRAN-TENZID**

PREPARATION AND CHARACTERISATION OF POLYELECTROLYTE COMPLEXES IN THE SYSTEM
DEXTRAN-SURFACTANT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eliška Klímová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1261/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Eliška Klímová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Příprava a charakterizace tvorby polyelektrolytových komplexů v systému dextran–tenzid

Zadání bakalářské práce:

- 1) Vybrat vhodné zástupce biopolymerů a opačně nabitých tenzidů pro tvorbu polyelektrolytových komplexů s dalším využitím v oblasti hydrogelových nosičových systémů.
- 2) Využít a optimalizovat metody rozptylu světla pro účely charakterizace tvorby polyelektrolytových komplexů ve zvolených systémech.
- 3) Prostudovat vliv zvýšené iontové síly na tvorbu interakcí ve stejném systému biopolymer–tenzid.
- 4) Vzájemně korelovat a diskutovat získaná data s přihlédnutím ke vlivu iontové síly.

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Eliška Klímová
student(ka)

Ing. Michal Kalina, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem přípravy a charakterizace tvorby polyelektrolytového komplexu v systému dextran-tenzid. V rámci této práce byly studovány interakce s přihlédnutím na vliv iontové síly ve zkoumaném systému. K těmto účelům byly zvoleny komponenty nesoucí opačný náboj, a to DEAE-dextran hydrochlorid a anionaktivní dodecylsulfát sodný. Pro jednotlivá měření byly využity hlavně metody rozptylu světla, zejména dynamický a elektroforetický rozptyl světla. Taktéž byly studovány interakce a agregační koncentrace jednotlivých komponent, při kterých výše uvedené polyelektrolytové komplexy vznikají. Měřením intenzity rozptýleného světla a Z-průměru velikosti částic byl u všech vzorků ověřen a pozorován značný nárůst ve velikostech částic způsobený vznikem těchto komplexů. V práci byl rovněž studován vliv tvorby polyelektrolytového komplexu na hodnotu pH a konduktivity systému. Tyto charakteristiky jsou důležité pro poskytnutí uceleného pohledu na tvorbu polyelektrolytového komplexu, což je podstatné zejména pro účely dalšího využití těchto systémů např. v medicínských aplikacích.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study on preparation and characterization of the polyelectrolyte complex formation in the dextran-surfactant system. The aim of the thesis was the investigation of the influence of the ionic strength on the formation of the interactions in the studied system. For these purposes, components having opposite charges (DEAE-dextran hydrochloride and anion-active sodium dodecyl sulphate) were selected. For individual measurements mainly the methods of light scattering, dynamic and electrophoretic light scattering in particular, have been used. In the thesis have been studied interactions and aggregation concentrations of individual components having the potential to form polyelectrolyte complexes. It was verified in all the studied samples, by measuring the intensity of scattered light and the size of Z-diameter of particles, that the increase in sizes of particles is caused by the formation of these complexes. There were also measured additional characteristics of the system such as pH or conductivity. Their dependences provide comprehensive view on the formation of complexes in studied system and can be utilized for other measurements and possible future applications, especially for purposes in medical applications.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyelektrolytové komplexy, biopolymery, tenzidy, rozptyl světla, velikost částic, zeta potenciál, vliv pH, konduktivita.

KEY WORDS

Polyelectrolyte complexes, biopolymers, surfactants, light scattering, particle size, zeta potential, pH effect, conductivity.

KLÍMOVÁ, E. *Příprava a charakterizace tvorby polyelektrolytových komplexů v systému dextran-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 50 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Michal Kalina, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato bakalářská práce byla vypracována samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Eliška Klímová

Poděkování:

Tímto bych chtěla ráda poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D., za veškerou pomoc, odborný dohled, vstřícný přístup a cenné rady při sepisování této práce. Velký dík samozřejmě patří celé mé rodině, která mě všechny ty roky podporovala ve studiu a poskytovala mi skvělé zázemí.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Polyelektrolyty	8
2.1.1	Struktura a vlastnosti polyelektrolytů	8
2.1.2	Rozdělení polyelektrolytů	8
2.1.3	Vznik a vlastnosti polyelektrolytových komplexů	8
2.1.4	Vazebné možnosti polyelektrolytových komplexů	10
2.2	Dextran	11
2.2.1	Struktura dextranu	11
2.2.2	Vlastnosti a využití dextranu	12
2.3	Tenzidy	13
2.3.1	Struktura a vlastnosti tenzidů	13
2.3.2	Tvorba micel	13
2.3.3	Povrchové napětí	14
2.4	Rozdělení tenzidů	14
2.4.1	Anionaktivní tenzidy	14
2.4.2	Kationaktivní tenzidy	15
2.4.3	Amfoterní tenzidy	15
2.4.4	Neionogenní tenzidy	16
2.5	Hydrogely	16
2.5.1	Vlastnosti a vznik hydrogelů	16
2.5.2	Rozdělení hydrogelů	17
2.5.3	Gely reverzibilní	17
2.5.4	Gely ireverzibilní	17
2.5.5	Fyzikálně vs. chemicky síťované gely	17
2.5.6	Využití hydrogelů	18
2.6	Metody studia polyelektrolytových komplexů	18
2.6.1	Metody rozptylu světla	18
2.6.2	Dynamický rozptyl světla	19
2.6.3	Elektroforetický rozptyl světla	20
2.6.4	SEC–MALS	21

3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1	Použité chemikálie	24
4.2	Použité přístroje.....	24
4.3	Příprava zásobních roztoků	24
4.4	Příprava koncentračních řad.....	24
4.5	Nastavení přístrojů	26
4.5.1	Dynamický rozptyl světla.....	26
4.5.2	Elektroforetický rozptyl světla	26
4.5.3	Velikostně vylučovací chromatografie.....	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
5.1	Charakterizace použitých materiálů	27
5.2	Studium tvorby polyelektrolytových komplexů.....	29
5.2.1	Potenciometrie a konduktometrie.....	29
5.2.2	Dynamický rozptyl světla.....	32
5.2.3	Elektroforetický rozptyl světla	34
5.3	Korelace výsledků z jednotlivých metod	36
6	ZÁVĚR	41
7	POUŽITÁ LITERATURA	42
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	46
8.1	Seznam použitých zkratk.....	46
8.2	Seznam použitých symbolů.....	46
9	PŘÍLOHY	47

1 ÚVOD

Problematika interakcí mezi opačně nabitými polyelektrolyty a tenzidy je v současné době velmi častým předmětem zkoumání. V mnoha studiích se vědci zabývají vlastnostmi těchto systémů, zejména pak jejich využitím. Tyto systémy mohou vytvářet biokompatibilní a biodegradabilní hydrogely, které jsou v dnešní době hojně využívány. Hydrogely mohou být dosti odlišné ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech, čímž se jejich aplikační potenciál ještě více rozšiřuje. Hydrogely jsou obecně poměrně citlivé na změny vnějších podmínek, proto je znalost jejich struktury velmi důležitá k pochopení jejich chování, které je často přirovnáváno k chování v reálných systémech.

V této práci byly zkoumány hydrogely připravené na bázi kladně nabitého polyelektrolytu a záporně nabitého tenzidu. Cílem této práce bylo prozkoumat možnosti přípravy těchto systémů a charakterizovat jejich vlastnosti a reaktivitu. Díky rozvoji analytických metod je dnes jejich popis mnohem snazší, než tomu bylo dříve. Do této práce byl jako zástupce ze skupiny polyelektrolytů vybrán modifikovaný DEAE-dextran hydrochlorid. Dextran byl zvolen díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě, zejména pak díky svému využití v medicínských aplikacích. Jako zástupce z řad záporně nabitých tenzidů byl vybrán dodecylsulfát sodný.

Ke studiu takto připravených polyelektrolytových komplexů byly vybrány metody rozptylu světla, a to zejména dynamický a elektroforetický rozptyl světla. Díky metodě založené na dynamickém rozptylu světla nám bylo umožněno sledovat změny v distribuci velikosti částic. Metodou elektroforetického rozptylu světla jsme měřili zejména hodnoty zeta potenciálu a s tím související stabilitu zkoumaného systému.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyelektrolyty

2.1.1 Struktura a vlastnosti polyelektrolytů

Polyelektrolyty řadíme mezi elektricky nabitě polymery (nebo makromolekuly). Jejich vlastnosti jsou určovány vzájemným působením elektrických sil, Brownovým pohybem a Van der Waalsovými silami. Ve vhodném polárním rozpouštědle (tím je nejčastěji voda) jsou schopny postranní skupiny polyelektrolytu elektrolytické disociace. Disociací vzniká tzv. makroiont s větším počtem elementárních nábojů a příslušný počet malých iontů opačného náboje (tzv. protiiontů). Mezi tyto molekuly patří například polystyrensulfonát, polymethakrylová kyselina, jejich soli nebo například amfoterní proteiny či nukleové kyseliny [1].

2.1.2 Rozdělení polyelektrolytů

Podle povahy skupin schopných disociace jsou polyelektrolyty děleny na:

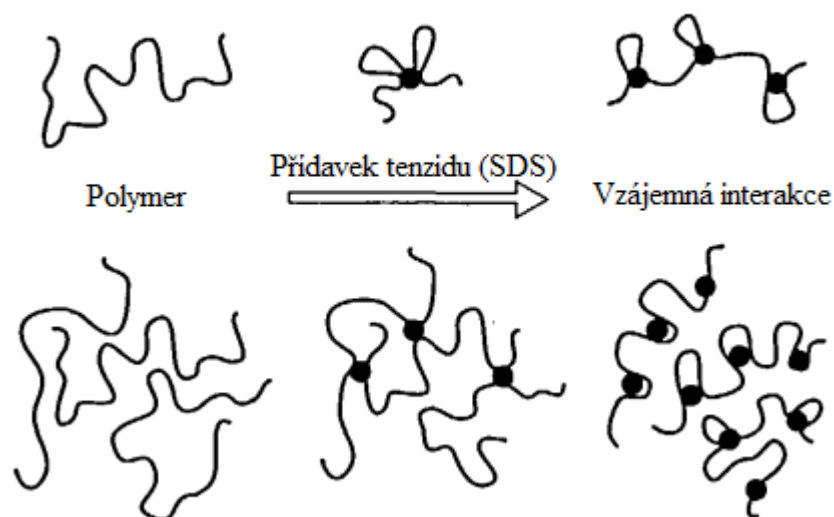
- polyelektrolyty obsahující kyselé skupiny např. --COO^- ,
- bazické, které obsahují jen zásadité skupiny např. --NH_3^+ ,
- amfoterní, které obsahují ve svých postranních řetězcích jak kyselé, tak i zásadité skupiny např. bílkoviny [2].

V molekulách může docházet k tomu, že dvě skupiny od sebe nebudou dostatečně vzdáleny, v tomto případě si pak mohou navzájem ovlivňovat velikosti svých disociačních konstant. U amfoterních makromolekul jsou při vysokých hodnotách pH disociovány jen skupiny kyselé, při nižších hodnotách pH disociují jen zásadité skupiny, a při středních hodnotách pH částečně disociují jak kyselé, tak zásadité skupiny a vznikají tak amfionty (neboli ionty obojetné). Pro amfionty je typické, že se v jedné molekule nachází náboj jak kladný, tak i náboj záporný. V tzv. izoelektrickém bodě se počet kladných a záporných nábojů vyrovná, tudíž se molekula navenek jeví jako elektricky neutrální [2].

2.1.3 Vznik a vlastnosti polyelektrolytových komplexů

Polyelektrolytové komplexy vznikají smísením roztoků polyaniontu a polykationtu. Tato reakce probíhá ve vodném prostředí o pH podobným hodnotám, jako je hodnota pK_a každého z polyiontů. Vzniklý komplex se může nacházet ve formě hydrogelu nebo např. koacervátu. Ke tvorbě polyelektrolytových komplexů vedou především elektrostatické interakce mezi ionizovanými skupinami polyiontů, ale uplatňují se zde i další sekundární reakce. Pro jejich přípravu nejsou potřebné katalyzátory ani např. iniciátory [3].

Nechtěnému srážení lze předejít přidavkem soli, např. NaCl, která sníží následně vznikající elektrostatickou přitažlivost. Ve zředěných roztocích se polyelektrolyty vyskytují spíše ve formě natažených řetězců, protože se zde nachází velké množství odpudivých sil mezi souhlasně nabitými skupinami [3].



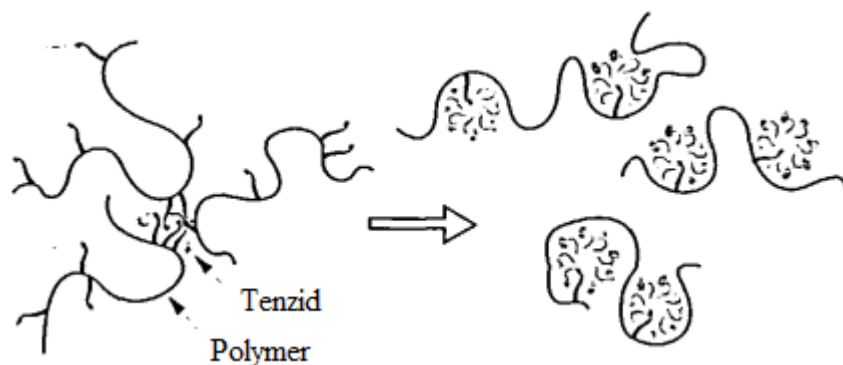
Obr. 1 – Znáznornění interakce polymeru a tenzidu [4]

Tvorba polyelektrolytových komplexů vede k poměrně odlišným strukturám, v závislosti na vlastnostech použitých složek a vnějších podmínkách reakce. V současné době se hovoří o dvou modelových strukturách. Struktura podobná žebříčku, tzv. zip mechanismus a model klubka, který má představovat shluk velkého množství řetězců. Na průběh tvorby polyelektrolytového komplexu a jeho výsledné vlastnosti, má však vliv mnoho dalších faktorů, např. interakce mezi použitými polymery, koncentrace jednotlivých látek, hustota nábojů na řetězcích, či volba vhodného rozpouštědla. Polyelektrolytové komplexy, obsahující skupiny s nízkou iontovou silou, mají poměrně vysokou stabilitu. Naopak komplexy obsahující skupiny s vyšší iontovou silou, či skupiny, které mají vyšší molekulovou hmotnost, jsou schopné se účastnit výměny polyiontů a podléhat tak substitučním reakcím. Z toho důvodu jsou komplexy polyelektrolytů často přirovnávány k „živým systémům“, které mohou velmi citlivě reagovat na změny v okolním prostředí. Ke sledování vzniku polyelektrolytových komplexů se dají využít metody, jako např. turbidimetrie, reologie, měření pH či vodivosti [5].

Díky vysokému obsahu vody a hustotě nábojů, představují polyelektrolytové komplexy vhodný materiál pro využití v medicíně nebo v kosmetologii. Polyelektrolytové komplexy tak našly své uplatnění v cílené distribuci léčiv, v tkáňovém inženýrství, nebo při hojení ran [6].

2.1.4 Vazebné možnosti polyelektrolytových komplexů

Jak již bylo zmíněno, na průběh tvorby polyelektrolytového komplexu má zásadní vliv mimo jiné volba vhodného rozpouštědla. V nevhodně zvolených rozpouštědlech se mohou jednotlivé komponenty shlukovat, a následně se zhroutit do forem hustých, sférických globulí. Systém se tímto způsobem brání a snaží se minimalizovat kontakty s jemu nepříznivým prostředím. Při interakci opačně nabitých složek najednou globule začnou měnit svůj celkový tvar a velikost. Tímto trendem se zabývali vědci již před více než 50 lety [3].

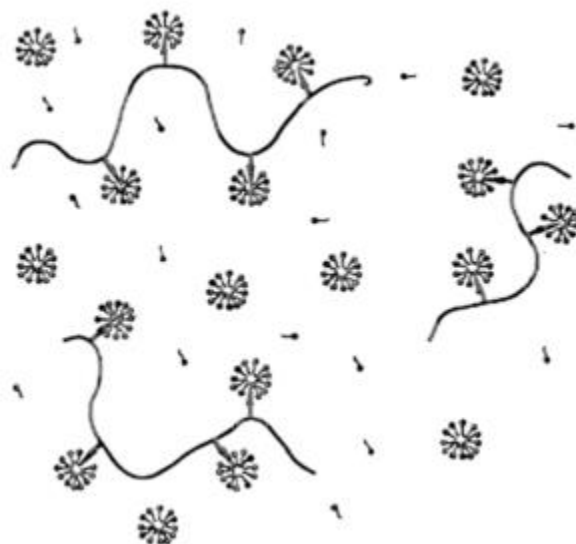


Obr. 2 – Znáznornění vzájemné interakce polymeru a tenzidu [4]

Elektrická dvojvrstva, která obklopuje polyionty v roztoku, obsahuje zvýšenou koncentraci protiiontů. Na rozdíl od roztoku, který obsahuje náhodně rozmístěné ionty, má elektrická dvojvrstva nižší energii, protože průměrná vzdálenost mezi opačně nabitými náboji je menší než mezi souhlasně nabitými náboji. Nižší je také samotná entropie systému, protože menší ionty jsou více omezovány v translačním pohybu. U nově vznikajícího polyelektrolytového komplexu dochází k částečnému rozpadu původních elektrických dvojvrstev a protiionty jsou následně uvolňovány do okolního roztoku, proto v systému dochází ke změnám entalpie a i entropie [7].

Změna entropie při vzniku nového komplexu je kladná. Je to způsobeno tím, že dvojvrstva brání uvolňování protiiontů do okolního roztoku. Při nízkých hodnotách iontové síly roztoku je koncentrace soli v globulích protiiontů mnohem vyšší než v roztoku. S rostoucí koncentrací soli v roztoku se naopak entropie nutná pro uvolnění protiiontů zmenšuje. Také ztráta konfigurační a translační entropie řetězců polyelektrolytů (při vzniku nového komplexu) přispívá ke změně entropie systému. Tento fakt odporuje tvorbě komplexů, ale pro delší řetězce převažuje hodnota entropie protiiontů, tudíž tvorba nových polyelektrolytových komplexů je řízena entropicky [7].

V závislosti na koncentraci soli, může být vznik komplexu exotermním či endotermním jevem. Za nízké koncentrace soli je vznik komplexu jevem exotermním, naopak za vysoké koncentraci soli se jedná o jev endotermní. Energie, která je nutná pro vytvoření komplexu, závisí na hustotě nábojů užitých polyelektrolytů. Slabě nabitě vykazují exotermní komplexaci a ty silně nabitě k sobě silně váží podstatně větší část protiiontů, takže vykazují komplexaci endotermní. V reálu se ale téměř vždy najdou výjimky. Dochází totiž ke změnám mezi endotermní a exotermní tvorbou komplexů, ke kolísání hustot nábojů a energií iontových dvojic. Celý průběh vzniku komplexu ovlivňují také chemické struktury použitých polyelektrolytů, Van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce, či vodíkové můstky [7].



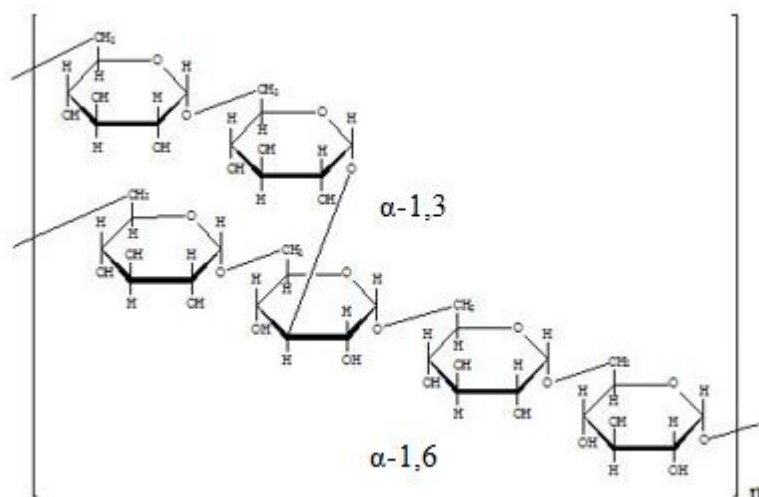
Obr. 3 – Znárodnění struktury komplexu v systému polymer-tenzid [4]

2.2 Dextran

2.2.1 Struktura dextranu

Dextran je homopolysacharid, skládající se z mnoha monosacharidových podjednotek. Jeho řetězce jsou tvořeny molekulami glukózy, které jsou vzájemně propojeny α -(1 \rightarrow 6) glykosidickými vazbami, zatímco větve začínají od vazeb α -(1 \rightarrow 3). Tato charakteristika rozvětvení rozlišuje dextran od dextrinu, což je glukózový polymer s přímým řetězcem, který je spojen α -(1 \rightarrow 4) nebo α -(1 \rightarrow 6) vazbami [8].

Dextran poprvé objevil Louis Pasteur, jako mikrobiální produkt ve víně. Dextran se syntetizuje ze sacharózy bakteriemi mléčného kvašení (jedná se o tzv. dextranové kvašení, kdy taktéž dochází k uvolňování molekul fruktózy) [9].



Obr. 4 – *Struktura dextranu* [10]

2.2.2 Vlastnosti a využití dextranu

Dextran se vyrábí v rozmezí molekulových hmotností od 1 000 Da do 2 000 000 Da. Molekulová hmotnost dextranu patří k jeho klíčovým vlastnostem. Dextranové frakce se ve většině případů chovají jako velmi pružné polymery. Tento polysacharid je snadno rozpustný ve vodě a ani pH jeho rozpustnost významně neovlivňuje. Jeho frakce jsou také rozpustné např. v methylsulfidu, ethylenglykolu či glycerolu, naopak nerozpustný je např. v methanolu, ethanolu, isopropanolu, či v acetonu nebo 2-propanonu. Tento polysacharid tvoří roztoky s relativně nízkou viskozitou. V práškové formě je silně hygroskopický, z tohoto důvodu se doporučuje skladovat za nepřístupu vzduchu a za nižší teploty. Tato práce se dále zabývá modifikovaným dextranem, a to konkrétně DEAE-dextran hydrochloridem [11].

Jak již bylo řečeno, dextrany jsou syntetizovány ze sacharózy pomocí prospěšných bakterií mléčného kvašení, jako jsou např. *Leuconostoc mesenteroides* či *Lactobacillus brevis*, ale také zubními plakotvornými druhy, např. *Streptococcus mutans*. Bakterie používají dextran pro tvorbu biofilmu nebo jako ochranné povlaky, např. k vyloučení hostitelských fagocytů (v případě patogenních bakterií) [12].

Dextran je znám především svým všestranným využitím. Používá se v různých oblastech průmyslu, nejvíce však ve farmacii a v zemědělství. V medicíně se používá např. jako antitrombotikum, ke snížení viskozity krve nebo v případě nouze u porodů, či při náhradě krevní plazmy. Zajímavostí je, že v lidském těle zvyšuje hladinu cukru v krvi (využití při hypoglykemii). Jeho univerzální použití se týká následujících příznivých vlastností. Je neutrální a nerozpustný ve vodě, snadno se filtruje, je biokompatibilní a jedná se o velmi stabilní látku (při dobrém skladování, je ho možno skladovat až 5 let) [10, 13].

2.3 Tenzidy

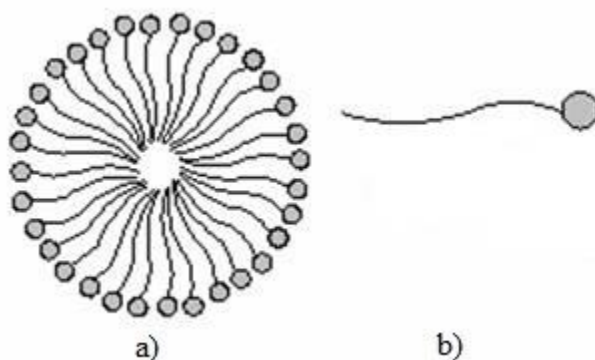
2.3.1 Struktura a vlastnosti tenzidů

Tenzidy jsou povrchově aktivní látky, které mají schopnost se hromadit již při nízkých koncentracích na fázovém rozhraní, a tímto způsobem tak snižovat napětí mezi jednotlivými fázemi látek. Molekuly tenzidu jsou charakteristické svou amfipatickou strukturou. Obsahují polární a nepolární část. Objemnější nepolární část se na fázovém rozhraní orientuje tak, že směřuje do nepolární fáze, a naopak polární část molekuly směřuje do fáze polární. Samotná adsorpce tenzidů na rozhraní dvou prostředí je orientována Van der Waalsovými silami [14].

Orientace platí jak mezi molekulami tenzidu a prostředím, tak mezi molekulami tenzidů navzájem. Adsorpcí na rozhraní dvou prostředí vzniká tzv. adsorbční vrstva, ve které je koncentrace tenzidu vyšší než v prostředích. Adsorpcí na rozhraní tenzidy snižují povrchové napětí. Postupným zvyšováním koncentrace tenzidu v daném prostředí začnou molekuly tenzidu zcela spontánně agregovat a začnou se tvořit tzv. micely [14].

2.3.2 Tvorba micel

Koncentrace, při které se začnou tvořit v roztoku micely, se nazývá kritická micelární koncentrace. Při dosažení kritické micelární koncentrace (dále jen CMC) se začnou výrazně měnit fyzikální a chemické vlastnosti tenzidů. Pod touto koncentrací je micelární koloid v systému pouze ve formě unimerních molekul, nad ní jsou naopak všechny molekuly přeměněny do větších celků, již zmiňovaných koloidních micel. Teplota, při níž se začaly tvořit micely, se nazývá Krafftova teplota. Jádro takto vzniklých micel má opačný charakter než použité rozpouštědlo a uvnitř micely tenzidu ve vodě, je tudíž prostředí nepolární. Tenzidy pak tímto způsobem mohou ve vodném prostředí zadržovat jinak zcela nerozpustné hydrofobní látky [15, 16].



Obr. 5 – Znáznornění struktury a) micely, b) tenzidu [15]

2.3.3 Povrchové napětí

Povrchové napětí je efekt, při kterém se povrch tekutiny snaží dosáhnout stavu s nejmenší energií, tzn. dosáhnout co možná nejhladšího stavu s minimálním rozpětím. Vše je dáno vzájemnými interakcemi přitažlivých sil molekul nebo atomů, z nichž se povrchová vrstva skládá. Povrchové napětí roztoků se mění s jejich koncentrací. Je známo, že řada látek, již v malých koncentracích vyvolává znatelné snížení povrchového napětí. Tyto látky bývají označovány jako tzv. povrchově aktivní (např. již zmiňované tenzidy). Na druhou stranu látky, které zvyšují povrchové napětí, jsou označovány za tzv. povrchově inaktivní. Co se týče teplotní závislosti povrchového napětí, s rostoucí teplotou vždy klesá. Vzhledem k tomu, že při kritické teplotě mizí rozhraní mezi kapalinou a plynou fází, klesne povrchové napětí za této teploty až na nulu. S povrchovým napětím velmi úzce souvisí i další veličina, a tou je kritická micelární koncentrace. CMC je nejvyšší možná koncentrace, při které se tenzid v roztoku nachází v molekulové nebo iontové formě. Při dosažení hodnoty této koncentrace se v důsledku vzniku micel mění směrnice koncentračních závislostí fyzikálně-chemických vlastností. Dochází zejména ke změně vodivosti, turbidity, osmotického tlaku či povrchového napětí. Její hodnotu také ovlivňuje délka a struktura řetězce užitých látek [2].

Z hlediska praxe je zajímavé hlavně to, že v důsledku uspořádání micel mohou být molekuly nepolárních sloučenin, jinak ve vodě zcela nerozpustných, uzavřeny uvnitř micel a tím být solubilizovány (pseudorozpuštěny). Jinak řečeno, roztok tenzidu začne fungovat jako detergent a vypere z oděvu mastnou špínu (až po překročení CMC). Proto patří její hodnota k důležitým charakteristikám tenzidů. Jednou z možností jejího stanovení je proměření závislosti povrchového napětí na koncentraci použitého tenzidu. Mezi nejpoužívanější techniky ke stanovení CMC u amfifilických sloučenin, patří také např. difúzní měření, fluorescenční spektroskopie či ultrazvuková spektroskopie [15, 16].

2.4 Rozdělení tenzidů

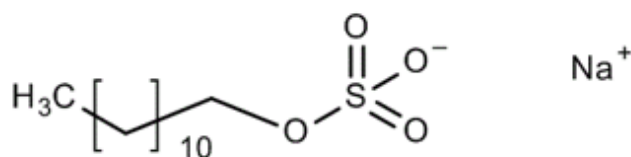
Tenzidy se obecně rozdělují na neionogenní a ionogenní. Ionogenní tenzidy se dále dělí na anionaktivní, kationaktivní a amfoterní. Dělení souvisí s jejich schopností disociovat ve vodném prostředí [2].

2.4.1 Anionaktivní tenzidy

Tyto tenzidy patří mezi nejrozšířenější. Nejvyžívanějšími sloučeninami z této skupiny tenzidů jsou sodné a draselné soli alkylbenzensulfonových kyselin (saponáty), alkoholsulfátů a alkoholethoxysulfátů. Z uvedených názvů vyplývá, že hydrofilní částí anionaktivních tenzidů je nejčastěji síranová skupina se záporným nábojem. Mýdlo (neboli sodná sůl vyšších mastných kyselin, obvykle $C_{12} - C_{18}$) patří mezi nejstarší a nejpoužívanější tenzid. Dalšími aniontovými tenzidy jsou např. sulfofukcináty, isothionáty či tauridy. Příkladem anionaktivního tenzidu je např. dodecylsulfát sodný, který tvoří značnou část této práce [2, 14].

Dodecylsulfát sodný (SDS)

Dodecylsulfát sodný (dále jen SDS) řadíme mezi již zmíněné anionaktivní tenzidy. Jedná se o amfifilní látku, bílého, práškovitého vzhledu. Ve vodném prostředí je schopen tvořit micely, tudíž ho můžeme považovat za detergent. S pojmem detergent se pojí jedna důležitá vlastnost, a tou je již zmiňovaná CMC. U SDS se hodnota CMC za laboratorní teploty (25°C) pohybuje kolem 7 až 10 mM. Je znám svým využitím zejména v oblasti kosmetiky, farmacie a potravinářství. V kombinaci s proteiny, může tvořit komplexy. V biochemických aplikacích se využívá k buněčné lýze, rozrušení buněčných struktur, solubilizaci proteinů či k elektroforetické separaci proteinů [17, 18].



Obr. 6 – *Struktura SDS* [18]

2.4.2 Kationaktivní tenzidy

Mezi kationaktivní tenzidy patří především kvartérní amoniové soli, kde dusíkový atom nese kladný náboj. Proiionty mohou být v tomto případě např. halogenidy. Tyto tenzidy mají mikrobicidní a avivážní účinek. V kosmetice se přidávají do vlasových kondicionérů, kde působí antistaticky. Kationaktivní tenzidy se s anionaktivními tenzidy nemíchají. Patří sem sloučeniny jako např. ajamin nebo septonex [2, 14].

2.4.3 Amfoterní tenzidy

Tyto tenzidy obsahují bazickou i kyselou funkční skupinu. Tyto skupiny jsou schopny ve vodném roztoku disociovat v závislosti na pH prostředí. Mají také významnou vlastnost a schopnost se mísit s aniontovými a kationtovými tenzidy. V alkalickém prostředí se chovají jako aniontové tenzidy, naopak v prostředí kyselém, se chovají jako tenzidy kationtové. Elektroneutrální charakter získávají v roztocích o takovém pH, které je příznivé pro tvorbu vnitřní soli. V tomto tzv. izoelektrickém bodě jsou již málo rozpustné a také se velmi snižuje jejich povrchově aktivní schopnost. Z přírodních látek mezi amfoterní tenzidy patří zejména rozpustné proteiny, fosfatidylseriny, sfingomyeliny, či lecithin. Ze syntetických látek sem patří např. deriváty betainu [2, 19].

2.4.4 Neionogenní tenzidy

Neiontové tenzidy nejsou schopné elektrolytické disociace. Jsou složeny z dlouhého uhlíkatého řetězce, na jehož koncích nesou polární, ale tzv. neiontové skupiny (např. hydroxylové či esterové). Tyto skupiny tvoří s molekulami vody vodíkové můstky, což vysvětluje jejich rozpustnost ve vodě. Ve vodném roztoku však na ionty nedisociují. Do této skupiny patří např. alkylpolyglykosidy [2, 19].

2.5 Hydrogely

2.5.1 Vlastnosti a vznik hydrogelů

Hydrogely představují dvou nebo vícesložkové disperzní systémy, skládající se z trojrozměrné sítě polymerních řetězců. Disperzním médiem je zde voda, která v této síťové struktuře vyplňuje celkový prostor. Pro hydrogely je typické, že jejich struktura je schopna pojmout až 99% vody. Hmotnostní podíl vody, je tudíž mnohonásobně vyšší než hmotnostní podíl polymeru. V důsledku jejich uspořádání, nejsou obvykle snadno rozpustné. Hydrogely vykazují značnou reaktivitu při změnách okolního prostředí. Citlivěji reagují např. na změnu pH, změnu rozpouštědla či na změnu teploty [20, 21].

Hydrogely mohou být připraveny buď ze syntetických polymerů, nebo z přírodních polymerů. Přírodní hydrogely jsou biokompatibilní a zcela netoxické. Přírodní polymery, tvořící hydrogely zahrnují proteiny (kolagen, želatinu) nebo polysacharidy (škrob, alginát či agarózu). Syntetické polymery jsou chemicky odolnější než ty přírodní. Jejich mechanická pevnost má za následek pomalý nástup degradace, a proto zajišťují hydrogelu větší mechanickou pevnost [20].

Hydrogely mohou být vytvořeny jedním, nebo více typy monomerů. Široká škála dostupných monomerů umožňuje přípravu hydrogelů téměř na míru tak, aby splňovaly požadavky budoucí aplikace. Obvykle se k hydrogelovému přípravku přidává menší množství síťovacího činidla. Polymerační reakce se pak běžně iniciuje např. ultrafialovým zářením, či chemickými katalyzátory. Volba vhodného iniciátoru závisí jak na typu použitých monomerů, tak i na užitých rozpouštědlech. Typická rozpouštědla použitá pro polymeraci v roztoku hydrogelu zahrnují vodu, ethanol, směs vody a ethanolu a benzylalkoholu v určitých, přesně definovaných poměrech [20].

Mezi klíčové vlastnosti hydrogelů patří bezesporu jejich biokompatibilita. Biokompatibilita představuje kompatibilitu mezi imunitním systémem a hydrogelem. Degradací produkty hydrogelu by samozřejmě neměly být toxické. V ideálním případě by měly být metabolizovány na neškodné produkty nebo by měly být ze systému zcela vyloučeny. Jejich hydrofilní povrch má při kontaktu s tělesnými tekutinami nízkou schopnost se vázat, což vede k nízkému přilnutí proteinů a buněk k jeho povrchu. Kromě toho jejich obecně elastická (gumová) povaha minimalizuje podráždění okolní tkáně [20, 22].

2.5.2 Rozdělení hydrogelů

Dle obsažených polymerů ve strukturách hydrogelů, se dělí do tří následujících skupin:

- homopolymerní – jsou tvořeny pouze jedním typem polymeru,
- multipolymerní – jsou tvořeny polymerní sítí, která se skládá ze dvou či více navzájem zesíťovaných typů polymerů,
- interpenetrující polymerní síť – ta obsahuje dvě nebo i více sítí, které jsou částečně propojeny, nikoli však kovalentními vazbami.

Hydrogely můžeme ještě rozdělit do více skupin, dle jednotlivých kritérií. Např. při pohledu na jejich strukturu, resp. dle jejich fyzikálních a chemických vlastností, je můžeme dělit na amorfní (nekrystalické), semikrystalické (směs složená z amorfní a krystalické fáze) a na zcela krystalické. Taktéž je můžeme klasifikovat z pohledu přítomnosti, či nepřítomnosti elektrického náboje [2, 20].

Dle chování ve vysušeném stavu, dělíme hydrogely mezi reverzibilní a ireverzibilní.

2.5.3 Gely reverzibilní

Při vysoušení zmenšují svůj objem a dávají kompaktní xerogely, které jsou schopné přecházet zpět do původního stavu po opětovném příjmu disperzního prostředí (jedná se o proces tzv. bobtnání). Do této skupiny patří např. makromolekulární gely. Prostorová struktura je tvořena sítí makromolekulárních řetězců, spojených působením sil fyzikální nebo chemické povahy. To vše se děje v místech, které jsou nazývány uzly, uzlové body či uzlové oblasti [2].

2.5.4 Gely ireverzibilní

Tyto gely mají ve vysušeném stavu přibližně stejný objem, jako původní lyogely, avšak jsou porézní. Při styku s disperzním prostředím jsou schopné určitě množství kapaliny sorbovat, ale lyogel tím nevzniká. Přeměna ireverzibilního gelu na xerogel je tedy nevratná [2].

2.5.5 Fyzikálně vs. chemicky síťované gely

Fyzikálně síťované gely (též zvané jako gely slabého typu) vznikají spojováním úseků polymerních řetězců působením fyzikálních sil (Van der Waalsových, polárních sil nebo vodíkovými vazbami) do uzlů, nebo spíše tzv. uzlových oblastí. Ty se netvoří na koncích řetězců, ale kdekoli mezi makromolekulami. Náhodně zapojené makromolekuly se většinou střídají s volnými úseky, které mají svou charakteristickou ohebnost a pevnost [2].

K celkové interakci dochází při nízké afinitě vysokomolekulární látky k rozpouštědлу (sníží se např. teplota nebo se zvýší její koncentrace). Typickou vlastností těchto gelů je, že se chovají elasticky jen při nižších hodnotách smykového napětí. Naopak při vyšších hodnotách, dochází k celkové degradaci sítě a rozpadu jednotlivých uzlů [2].

Kovalentně (chemicky) síťované gely (též zvané jako gely silného typu) představují trojrozměrnou síťovitou strukturu tvořenou chemickými vazbami. Kovalentní uzly se pokládají za trvalé, stálé a jejich spoje jsou velmi pevné. Právě pevnost chemicky síťovaných gelů, je důležitý a často zkoumaný parametr u reologických studií. Pro oba typy gelů platí, že po překročení tzv. statické meze toku (neboli kritické hodnotě napětí) dochází k jejich trvalé deformaci. Na chemicky síťované gely má však vliv i mnoho dalších faktorů, např. teplota, koncentrace, pH nebo mechanické podmínky [2, 22].

2.5.6 Využití hydrogelů

První poznatky o přípravě hydrogelů, pochází z roku 1954. Od té doby uplynulo již mnoho let, a to se také podepsalo na rozmachu jejich využití. Hydrogely našly své uplatnění např. v hygienických výrobcích, zemědělství, distribuci léčiv, či u procesu odvodňování uhlí, v potravinářství, farmacii, biomedicínských aplikacích, či v tkáňovém inženýrství. Proces gelace je důležitý pro celou řadu výrob. Využívá se např. při výrobě vláken, zpracování kůží, nebo při aplikaci lepidel. Ve farmacii se proces gelace využívá hlavně k přípravě gelových kapslí [20, 22].

Neustále se zkoumají nové a nové monomery, které by se do hydrogelů mohly inkorporovat, což souvisí s jejich narůstající použitelností. Již zmíněné hydrogely pro hygienické aplikace, jsou založeny zejména na kyselině akrylové a jejích solích. Naopak základní složkou v hydrogelových přípravcích, využívajících se zejména v oblasti zemědělství, je akrylamid [22].

2.6 Metody studia polyelektrolytových komplexů

2.6.1 Metody rozptylu světla

Koloidní soustavy jsou systémy, ve kterých se jedna látka disperzní fáze (pokud možno velmi jemně rozptýlena) nachází v jiné látce, a to tzv. disperzním prostředím. Tento systém, se pak nechová jako pravý roztok, a taktéž se svými vlastnostmi liší od hrubých disperzí, kde samotná velikost rozptýlených částí dosahuje rozměrů, které jsou pozorovatelné lidským okem. Zejména optické vlastnosti koloidních soustav, jsou závislé na jejich fyzikálních vlastnostech [23].

K nejvýznamnějším vlastnostem koloidních soustav patří jejich velikost, elektrická vodivost, absorpce či rozptyl světla. Měření rozptylu světla, umožňuje určit např. molekulovou hmotnost nebo další informace o celkové struktuře zkoumané látky. Mezi základní techniky rozptylu světla patří dynamický rozptyl světla, statický a elektroforetický rozptyl světla [2, 23].

2.6.2 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (dále jen DLS), je založen na měření světla, které rozptylují částice vzorku v závislosti na čase. Základem této neinvazivní techniky je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla pohybujícími se částicemi v analyzovaném vzorku. Tyto fluktuace souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla rozptýleného na nestacionárních částicích disperzní fáze, pohybující se na základě Brownovu pohybu. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Jedná se o pohyb jednotlivých částic, který je způsoben nárazy mezi molekulami samotných koloidních částic a molekulami použitého disperzního prostředí. Brownův pohyb ovlivňuje difúzi, sedimentaci a celkovou stabilitu koloidních soustav. Rychlost Brownova pohybu je definována pomocí difúzního koeficientu D . Časová závislost intenzity rozptýleného světla je analyzována tzv. autokorelací. Následně je možné stanovit distribuci velikosti částic a popsat pohyb částice v médiu měřením difúzního koeficientu částice. Tento koeficient můžeme převést na velikost částic pomocí následující Stokes – Einsteinovy rovnice:

$$d_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}, \quad (1)$$

kde d_H je hydrodynamický poloměr (odpovídá poloměru koule, která by měla za stejných podmínek stejný difúzní koeficient, jaký je naměřen), k_B je tzv. Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita použitého disperzního prostředí [23, 24].

Pohyb částic je ovlivněn více faktory. Samozřejmě čím vyšší je teplota, tím se molekuly pohybují rychleji. Čím vyšší je viskozita použitého rozpouštědla, tím více klesá rychlost pohybu částic, a čím větší molekuly v roztoku jsou, tím pomaleji se budou pohybovat. Intenzita rozptýleného světla, podle Stokes – Einsteinovy rovnice, je přímo úměrná hydrodynamickému poloměru částice d_H . Tato metoda patří mezi tzv. metody absolutní, což znamená, že zde není potřeba provádět kalibraci pomocí standardů o přesně známých velikostech [23, 24].

Klíčovým prvkem instrumentace DLS je laser, který slouží k osvětlení částic vzorku v cele. Mohou nastat dva případy. Laserový paprsek buď projde skrze vzorek nebo je rozptýlen částicemi obsaženými ve vzorku. Detektor pak sleduje měření intenzity rozptýleného světla (bývá umístěn pod úhlem 173°). Důležité je chránit detektor, a tak je v přístroji zakomponován i tzv. zeslabovač (neboli attenuator), který měřitelnou intenzitu prošlého světla částečně zeslabuje [25].

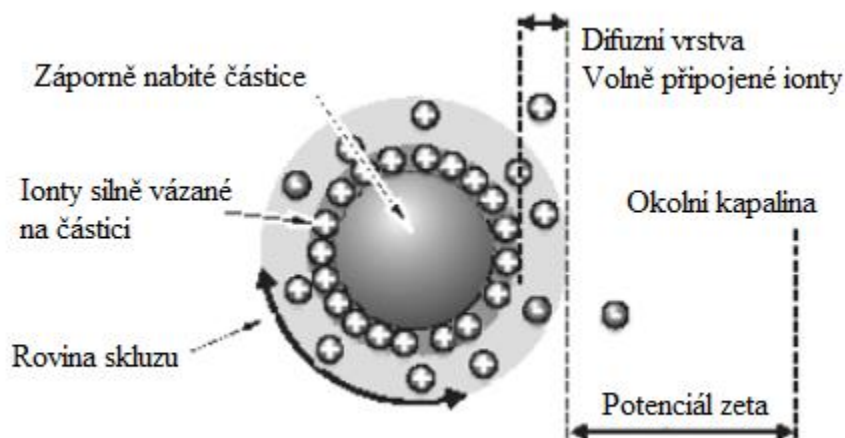
2.6.3 Elektroforetický rozptyl světla

Elektroforetický rozptyl světla (dále jen ELS), se využívá k charakterizaci povrchového náboje zkoumaných koloidních soustav v kapalných disperzních prostředích. Pro koloidní částice je typický jejich malý rozměr a s tím naopak spojen extrémně velký specifický povrch. Tento povrch má za důsledek, že fázové rozhraní částice-kapalina mnohdy může silně ovlivňovat jejich fyzikální vlastnosti (např. disperzitu či stabilitu). Kolem nabitých koloidních částic se shromažďují ionty opačných znamének, a vznikají tak dvě nabitě vrstvy, které dávají vznik tzv. elektrické dvojvrstvě. Ve vzdálenější části (tzv. difúzní části) této dvojvrstvy působí adsorpční síly méně než v té bližší části, kde adsorpční síly působí větší silou [26].

Základem instrumentace metody ELS je laserový zdroj světla, který putuje do tzv. děliče, kde je rozložen na další dva paprsky. Jeden z paprsků se označuje jako referenční, druhý paprsek putuje do kyvety se vzorkem. Opět se zde nachází tzv. zeslabovač, který snižuje intenzitu dopadajícího paprsku a intenzitu rozptýleného světla (důvodem je opět ochrana detektoru). Paprsek projde vzorkem, dopadne na částici, a poté dochází k jeho následnému rozptýlení, které bývá nejčastěji snímáno pod úhlem 12,8°. Celé měření probíhá v elektrickém poli. Detektor (nejčastěji fotodioda či fotonásobič) zde převádí signál do PC zařízení. Výstupem této metody je hodnota elektroforetické pohyblivosti a zeta potenciálu [26].

Zeta potenciál

Zeta potenciál je označení pro elektrokinetický potenciál v koloidních systémech, který působí na rozhraní mezi povrchovou vrstvou částice a okolní kapalinou. Zeta potenciál neboli elektrokinetický potenciál určuje hodnotu potenciálu na rovině skluzu částice. Na rozhraní pevné látky a kapaliny závisí také na řadě dalších faktorů, jako je např. koncentrace iontů, náboj iontů, pH, či teplota měřeného roztoku. Měření tohoto potenciálu patří k metodám charakterizace povrchu nabitých koloidních soustav [27].



Obr. 7 – Zeta potenciál [28]

S možným přitahováním či odpuzováním částic, souvisí právě jeho hodnota. Jestliže je hodnota zeta potenciálu větší než +30 mV nebo menší než -30 mV, jedná se o stabilní disperzní systém. Princip je takový, že když mají částice vysoce kladný, či vysoce záporný zeta potenciál, navzájem se odpuzují, tím pádem se neshlukují, a proto se tyto systémy považují za stabilní. Naopak v rozmezí těchto dvou hodnot se disperze považuje za nestabilní (částice se mohou shlukovat) [28, 29].

2.6.4 SEC–MALS

Tato metoda je založena na výhodné kombinaci chromatografické separační techniky a detekce statického rozptylu světla. Výstupem této metody je distribuce molekulové hmotnosti a velikosti částic zkoumané látky. Zkratku SEC můžeme chápat, jako vylučovací chromatografii (z angl. size exclusion chromatography). Vše závisí na interakcích systému mezi stacionární a mobilní fází [30].

Během SEC chromatografie dochází k efektu tzv. molekulového síta, kdy systémem projdou nejrychleji molekuly větších rozměrů, protože nedifundují do stacionární fáze, naopak je tomu u menších molekul. Menší molekuly difundují do pórů stacionární fáze, jsou systémem zadržovány, a proto z kolony vychází až po delších čase. Zkratka MALS je označení pro užitý detektor (z angl. multiangle light scattering). Oddělené molekuly putují z kolony do MALS detektoru, kde jsou ozářeny laserem a rozptýlené světlo se dále zachycuje pod více úhly, ze kterých je signál veden do PC a zde je dále zpracováván [30].

Po převodu signálu do PC, lze vytvořit závislost rozptýleného světla na úhlu detekce, následnou extrapolací a dalšími úpravami lze vypočítat molekulovou hmotnost. Výhodou použití metody SEC–MALS je fakt, že poskytuje absolutní měření. Nevyžaduje tak srovnání s molárními hmotnostmi standardů ani kalibraci [31].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Primárním cílem této bakalářské práce bylo studium tvorby polyelektrolytového komplexu, v systému kladně nabitého biopolymeru DEAE-dextran hydrochloridu a záporně nabitého tenzidu dodecylsulfátu sodného. Tvorba polyelektrolytového komplexu mezi oběma zmíněnými komponentami představuje iniciační krok při následné tvorbě hydrogelu. Právě hydrogel na bázi tohoto systému by mohl nalézt potenciální využití v medicíně jako nosičový systém pro další aktivní látky. Znalost podmínek, při jakých dochází k agregaci v systému a rovněž způsobu, jak například jednoduchou změnou podmínek posunout rovnováhu tvorby komplexu směrem k produktu, resp. výchozím látkám, představuje nezbytnou podmínku pro budoucí cílenou přípravu hydrogelu tzv. na míru pro danou aplikaci.

Na vzniku polyelektrolytových komplexů se podílí řada interakcí, které následně vyvolávají změny mnoha dalších parametrů. Mezi ty nejdůležitější patří změna pH, iontová síla či vodivost. Vznik polyelektrolytového komplexu, resp. hydrogelu může být iniciován interakcemi dvou opačně nabitých látek. V současné době je oblast studia hydrogelů na bázi takto modifikovaného dextranu a dodecylsulfátu sodného stále na počátku zkoumání [2].

Jak už bylo zmíněno, dextran je hojně využíván zejména v lékařství a farmaceutickém průmyslu. V současné době se zkoumají nanočástice potažené dextranem a jejich účinek, při intranukleárním podání u léčeného karcinomu prsu. Revoluce nového přístupu k léčbě rakoviny prsu odhalila nové výsledky, z nichž vyplývá, že užití takto modifikovaného dextranu by mohlo přispět k rychlejší, a tudíž efektivnější léčbě. K léčbě nádorových onemocnění se v lékařství používají cytostatika, k těm nejpoužívanějším patří např. paclitaxel. Jedná se o rostlinný alkaloid ze skupiny taxanů. Je známo, že cytostatika mohou škodit i jinak zdravým buňkám, a právě tomuto by měl modifikovaný DEAE-dextran zabránit. V současné době bylo prokázáno, že nanočástice s takto modifikovaným DEAE-dextranem vykazují významnou synergickou cytotoxicitu v různých buněčných liniích [32].

Rakovina se objevila jako globální hrozba s výzvami pro bezpečnou chemoterapeutiku. Většina současně dostupných cytostatik vykazuje poměrně vysokou toxicitu. Mezi novými činidly vykazují interferony antiproliferační a cytoprotektální vlastnosti. DEAE-dextran tyto problémy se stabilitou dokáže vyřešit. Přišlo se na to, že léčba přípravkem takto modifikovaného dextranu neprokázala žádnou významnou toxicitu srdce, jater, ledvin či gastrovaskulárního traktu, lymfatického systému ani změnu samotné fyziologie těla. Lze tudíž konstatovat, že modifikovaný dextran je bezpečné protirakovinné činidlo bez jakékoli subakutní toxicity k lidskému organismu [33].

V práci [34] se autoři zabývali charakterizací DEAE-dextran-methylmethakrylátu. Tato látka je používána jakožto nevirový genový nosič. Stabilní a mýdlový latex takto rozpuštěného kopolymeru byl vyvinut pro vektory k přenosu virů. Vytváří poměrně snadno polyiontový komplex s DNA. Bylo potvrzeno, že má vysokou ochrannou schopnost pro zabránění degradace DNÁzy. Transfekční aktivita byla stanovena s použitím beta-galaktosidázového testu a vyšší hodnota byla potvrzena i ve srovnání se vzorky DEAE-dextranu hydrochloridu. Výsledný DEAE-dextran-methylmethakrylát, který má amfifilní domény uspořádané tak, aby byl schopen tvořit polymerní micely, by se měl stát jakýmsi stabilizátorem celkového systému. Komplex společně s plasmidovou DNA vykazuje dobrou afinitu k buněčné membráně. Tyto komplexy vytváří kompaktnější struktury, a proto se infračervené absorpční spektrum posouvá do stavu vyšších energií. Dospělo se tedy k závěru, že kondenzace DNA může mít vysokou účinnost transfekce pomocí DEAE-dextranu-methylmethakrylátu. Vysoká účinnost tohoto roubovaného kopolymeru, který je určitým způsobem stabilizován, může být cenným nástrojem pro bezpečné dodávání a přesunu určitého genu (nebo skupiny genů), například v oblasti genového inženýrství. Tento výzkum přispěl i k rozvoji dalším biochemickým metodám.

V posledních letech se řada výzkumů zaměřuje na využití a charakterizaci tvorby polyelektrolytového komplexu v systému na bázi polymeru a opačně nabitě, povrchově aktivní látky. Příkladem je práce [35], ve které byla studována řízená agregace dodecylsulfátu sodného (dále jen SDS) ve vodných roztocích polyethylenglykolu (dále jen PEG). Zkoumaly se interakce PEG o různých molekulových hmotnostech a SDS, pomocí metod měření povrchového napětí a vodivosti. Izotermy povrchových napětí naznačovaly přítomnost dvou zlomů v případě PEG s vysokou molekulovou hmotností. V prvním bodu zlomu bylo naměřeno minimální povrchové napětí, které připadalo nástupu interakce PEG–SDS, což vedlo ke tvorbě dalších agregátů SDS na PEG řetězcích. Druhý zlomový bod byl způsoben tvorbou volných SDS micel. Dále byly měřeny i vodivosti jednotlivých roztoků. Následně přidáný NaCl byl zodpovědný za další agregaci SDS. Tato studie poukázala na význam elektrostatických interakcí v komplexech polymer-surfaktant a významně přispěla k jejímu dalšímu rozvoji.

V práci [36] byl naopak dodecylsulfát sodný použit jakožto materiál simulující strukturu biologických membrán. V této práci se zkoumal účinek aminokyseliny (konkrétně glycinu) na mezomorfnní vlastnosti systému SDS–glycin–voda. Údaje o interakci dodecylsulfátu sodného s vodou a glycinem získané chemickým modelováním, odůvodňují posun ve tvorbě hexagonálních lyfocytů za nižší koncentrace povrchově aktivního činidla. Vzhledem k tomu, že tvorba komplexů mezi povrchově aktivními látkami a aminokyselinami je podobná micelární rozpustnosti, pochopení těchto procesů je důležité jak v biologii, tak v různých oblastech praktických aplikací povrchově aktivních látek.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- **Dodecylsulfát sodný:** Sigma Aldrich, číslo šarže: 1353471, CAS: 151-21-3, čistota: $\geq 98,5\%$.
- **DEAE-dextran hydrochlorid:** Sigma Aldrich, powder, číslo šarže: 109K0027V, CAS: 9064-91-9.
- **Chlorid sodný:** Lach-Ner, s.r.o., číslo šarže: 1903200314, CAS: 7647-14-5, čistota: $\geq 99,9\%$.
- **Deionizovaná voda:** PURELAB-flex, ELGA-LabWater, USA.

4.2 Použité přístroje

- pH metr (Mettler Toledo)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)
- Velikostně-vylučovací chromatografie (SEC-MALS-dVI-dRI systém, kombinace od výrobců Agilent Technologies a Wyatt Technology)

4.3 Příprava zásobních roztoků

V rámci této bakalářské práce byly použité koncentrační řady DEAE-dextran hydrochloridu a SDS studovány ve dvou disperzních prostředích. Prvním byla ultračistá destilovaná voda a druhým pak 0,15M NaCl. Pro přípravu 0,15M NaCl byla k naváženému množství NaCl přidána deionizovaná voda (dále jen DV) a roztok byl míchán do následujícího dne. Rozpuštěný NaCl byl následně kvantitativně převeden z kádinky do odměrné baňky o požadovaném objemu.

Jako zástupce anionaktivního tenzidu byl zvolen SDS. Pro přípravu zásobního roztoku SDS o koncentraci 100 mM byla vždy požadovaná navážka SDS převedena do odměrné baňky a doplněna příslušným disperzním prostředím po rysku (DV resp. 0,15M NaCl).

V této bakalářské práci byl jako zástupce kladně nabitého biopolymeru zvolen DEAE-dextran hydrochlorid. Pro práci byly zvoleny koncentrace 10; 20 a 40 g/l. Jednotlivé roztoky byly připraveny jak v prostředí 0,15M NaCl, tak v prostředí DV. Pro důkladné rozpuštění studovaného DEAE-dextran hydrochloridu byly roztoky míchány po dobu 2 dnů.

4.4 Příprava koncentračních řad

Stěžejní částí této práce byla příprava jednotlivých koncentračních řad pro následné studium tvorby polyelektrolytového komplexu v systému dextran-SDS pomocí metod rozptylu světla. Příprava vzorků spočívala v nadávkování 5 ml příslušného zásobního roztoku dextranu a doplněním SDS a disperzním prostředím na celkový objem 10 ml tak, aby výsledná koncentrace SDS v řadě byla 0; 1; 5; 10; 15; 20; 30; 40 a 50 mM. V jednotlivých připravených řadách s rozdílnou koncentrací SDS pak byla výsledná koncentrace dextranu 5, 10 resp. 20 g/l. Sesummarizované přípravy koncentračních řad naleznete v Tab. 1 a Tab. 2. Fotografie jednotlivých koncentračních řad jsou uvedeny v příloze práce (viz. Přílohy).

Tab. 1 – Příprava koncentrační řady 5 g/l DEAE-dextran hydrochloridu
v prostředí deionizované vody (DV)

Číslo vzorku	c_{SDS} [mM]	V_{SDS} [ml]	V_{DV} [ml]	$V_{10 \text{ g/l DEAE-dextran hydrochlorid}}$ [ml]
1	0	0,0	5,0	5
2	1	0,1	4,9	5
3	5	0,5	4,5	5
4	10	1,0	4,0	5
5	15	1,5	3,5	5
6	20	2,0	3,0	5
7	30	3,0	2,0	5
8	40	4,0	1,0	5
9	50	5,0	0,0	5

Dle Tab. 1 byla připravena koncentrační řada DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí deionizované vody o výsledné koncentraci 5 g/l. Další koncentrační řady (o výsledných koncentracích dextransu 10 a 20 g/l) byly připraveny obdobným způsobem. Do roztoků byly ovšem přidány zásobní roztoky DEAE-dextran hydrochloridu o koncentraci 20 resp. 40 g/l.

Tab. 2 – Příprava koncentrační řady 5 g/l DEAE-dextran hydrochloridu
v prostředí zásobního roztoku 0,15M NaCl

Číslo vzorku	c_{SDS} [mM]	V_{SDS} [ml]	V_{NaCl} [ml]	$V_{10 \text{ g/l DEAE-dextran hydrochlorid}}$ [ml]
1	0	0,0	5,0	5
2	1	0,1	4,9	5
3	5	0,5	4,5	5
4	10	1,0	4,0	5
5	15	1,5	3,5	5
6	20	2,0	3,0	5
7	30	3,0	2,0	5
8	40	4,0	1,0	5
9	50	5,0	0,0	5

Dle Tab. 2 byla připravena koncentrační řada DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí 0,15M NaCl o výsledné koncentraci 5 g/l. Další koncentrační řady (o výsledných koncentracích dextranu 10 a 20 g/l) byly připraveny obdobným způsobem. Do roztoků byly ovšem přidány zásobní roztoky DEAE-dextran hydrochloridu o koncentraci 20 resp. 40 g/l.

Celkem tedy byly připraveny 3 koncentrační řady DEAE-dextran hydrochloridu (o finální koncentraci dextranu 5, 10 a 20 g/l) po 9 vzorcích (koncentrace SDS 0 – 50 mM), vždy po třech opakováních. Celkem tedy bylo proměřeno 81 vzorků v každém disperzním prostředí (DV resp. 0,15M NaCl). Takto připravené vzorky byly podrobeny následné charakterizaci pomocí potenciometrie, konduktometrie, DLS a ELS.

4.5 Nastavení přístrojů

4.5.1 Dynamický rozptyl světla

Pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS byla proměřena distribuce velikosti částic. Měření probíhalo ve speciálních skleněných kyvetách. Pro měření byla nastavena měřicí pozice v kyvetě 1 mm od stěny kyvety. Během měření byl detekován tzv. zpětný rozptyl světla. Při tomto nastavení je detektor umístěn pod úhlem 173° vůči směru zdrojového laserového paprsku, kterým je monochromatický červený laser o vlnové délce 633 nm. Jedno měření představovalo průměr z 15 individuálních 10 sekundových skenů. Měření každého vzorku bylo třikrát opakováno.

4.5.2 Elektroforetický rozptyl světla

Touto metodou byla zkoumána a měřena stabilita všech připravených vzorků. Měření probíhalo taktéž na přístroji Zetasizer Nano ZS. Nejprve probíhalo měření distribuce velikosti částic, a poté se vzorky použily pro měření zeta potenciálu a konduktivity (protože procházející elektrický proud vlastnosti vzorku nenávratně mění). Před započítáním měření bylo nutné do kyvety se vzorkem, ponořit tzv. dipp elektrodu. Výsledky, které jsou uvedeny dále, představují zprůměrované hodnoty získané vždy z celkem pěti opakování.

4.5.3 Velikostně vylučovací chromatografie

Pro určení molekulové hmotnosti studovaných vstupních surovin (DEAE-dextran hydrochloridu a SDS) byla využita metoda SEC-UV/VIS-MALS-dVI-dRI, kde MALS je podstatný detektor pro stanovení molekulové hmotnosti (k měření dochází z úhlové závislosti rozptylu světla), zkratka dVI představuje diferenční viskozimetr, který charakterizuje konformaci a větvení jednotlivých řetězců. Zkratka dRI nese označení pro koncentrační detektor. Chromatografická část a UV/VIS použitého přístroje byla dodána od firmy Agilent Technologies a zbylé detektory byly zakoupeny od firmy Wyatt Technology. Pro SEC separaci byla využita kolona typu PL aquagel-OH MIXED-H o rozměrech 300×7,5 mm. Pro měření byla použita mobilní fáze NaNO₃ o koncentraci 0,1 M s přídavkem 3 mM NaN₃. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,6 ml/min a objem nástřiku jednoho vzorku na 100 µl. Pro měření byla využita hodnota inkrementu indexu lomu $dn/dc=0,143$ ml/g. Před samotným měřením byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 5 µm.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace použitých materiálů

Materiály využitě pro tuto bakalářskou práci, tj. DEAE-dextran hydrochlorid a dodecylsulfát sodný (dále jen SDS), byly podrobeny bližší charakterizaci. U všech studovaných zdrojových materiálů tak pomocí dynamického rozptylu světla byla změřena distribuce velikosti částic a následně byl stanoven Z-průměr velikosti částic. Pomocí metody elektroforetického rozptylu světla byl proměřen zeta potenciál a bylo rovněž určeno pH následně i vodivost studovaných vzorků. Jednotlivá měření byla provedena jak v prostředí deionizované vody, tak v prostředí 0,15M NaCl. Roztok NaCl o koncentraci 0,15 M byl zvolen proto, že se nejvíce blíží fyziologickému roztoku, resp. dokáže nejlépe simulovat podmínky v těle. Veškeré výsledky jsou uvedeny v Tab. 3 a Tab. 4.

Tab. 3 – Charakterizace DEAE-dextran hydrochloridu a) v prostředí deionizované vody (DV), b) v prostředí 0,15M NaCl

Veličina	a) Prostředí DV		
Koncentrace [g/l]	10	20	40
Molekulová hmotnost [kDa]	667 ± 35	651 ± 30	688 ± 13
Z-průměr velikosti částic [nm]	1389,08 ± 101,12	1812,7 ± 1,4	3493,5 ± 2,5
Zeta potenciál [mV]	38,4 ± 0,6	32,4 ± 1,8	27,44 ± 0,07
pH [-]	3,9 ± 0,4	3,6 ± 0,4	4,0 ± 0,2
Konduktivita [mS/cm]	0,81 ± 0,12	1,51 ± 0,08	2,73 ± 0,04
Veličina	b) Prostředí 0,15M NaCl		
Koncentrace [g/l]	10	20	40
Molekulová hmotnost [kDa]	653 ± 29	656 ± 28	653 ± 7
Z-průměr velikosti částic [nm]	87,8 ± 2,9	75,26 ± 1,05	96,7 ± 9,9
Zeta potenciál [mV]	17,6 ± 1,2	17,0 ± 1,1	16,7 ± 1,7
pH [-]	4,8 ± 0,4	4,5 ± 0,2	4,1 ± 0,2
Konduktivita [mS/cm]	15,1 ± 0,4	15,2 ± 0,4	16,3 ± 0,2

Tab. 4 – Charakterizace SDS v prostředí a) deionizované vody (DV), b) v prostředí 0,15M NaCl

Veličina	a) Prostředí DV	b) Prostředí 0,15M NaCl
Koncentrace [mM]	100	100
Molekulová hmotnost [kDa]	$0,289 \pm 0,003$	$0,288 \pm 0,002$
Z-průměr velikosti částic [nm]	$18,9 \pm 4,5$	$12,318 \pm 0,018$
Zeta potenciál [mV]	$-91,5 \pm 9,3$	$-28,6 \pm 6,9$
pH [-]	$5,86 \pm 0,05$	$5,817 \pm 0,005$
Konduktivita [mS/cm]	$1,24 \pm 0,11$	$14,21 \pm 0,08$

V Tab. 3 si můžeme všimnout výrazné změny ve velikosti částic. Je evidentní, že na velikost částic má přidavek soli značný vliv. Částice DEAE-dextran hydrochloridu zaujímají v prostředí deionizované vody konformace náhodně uspořádaných klubek. Tato konformace se však přidáním soli výrazně změní, a to se projeví na změně velikosti částic. S přidavkem soli (resp. se zvyšující se iontovou silou) začnou tyto klubka přetvářet svou konformaci a měnit se na menší, kompaktní koule. Právě tato změna způsobí pokles v hodnotách velikostech částic.

Z Tab. 3 je také zřejmé, že zvýšení iontové síly roztoku, má vliv na hodnotu zeta potenciálu. Zeta potenciál nabývá v prostředí deionizované vody hodnot vyšších, než v prostředí 0,15M NaCl. Je to způsobeno tím, že přidání elektrolytu ovlivňuje povrchovou vrstvu dodecylsulfátu sodného a dochází zde k částečnému odstínění jeho náboje. Ionty použitého elektrolytu nesoucí kladný náboj (zejm. ionty Na^+) začnou interagovat a postupně odstiňovat záporný náboj na SDS, což způsobí pokles hodnoty zeta potenciálu. Hodnota zeta potenciálu však stále nabývá kladných hodnot a pohybuje se v rozmezí zhruba -30 mV až $+30 \text{ mV}$, což poukazuje na stabilitu tohoto roztoku soli.

Hodnota pH s rostoucí koncentrací použitého biopolymeru postupně klesá, což je očekávaný jev. Důvodem je fakt, že modifikovaný dextran obsahuje kyselý vodík. S rostoucí koncentrací dextransu tak dojde k navýšení obsahu tohoto kyselého vodíku, což se projeví v rostoucí kyselosti roztoku a rovněž naměřenou nižší hodnotou pH vzorku.

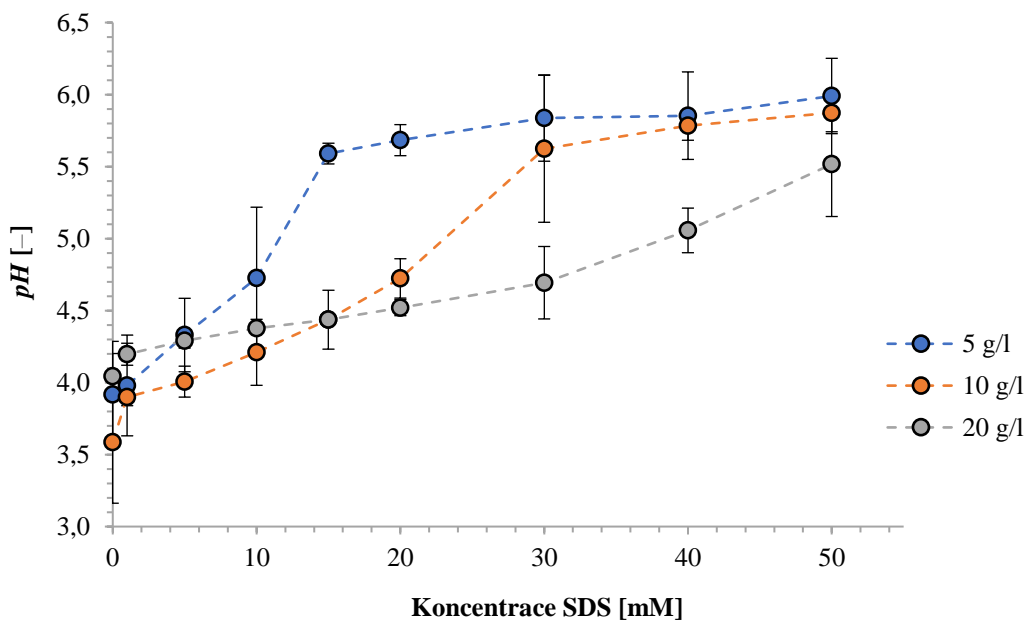
Naopak je tomu v Tab. 4, kde už ke změně velikosti částic SDS nedochází. U SDS totiž nedochází k tak výrazným změnám konformací molekul. Zvýšení iontové síly má opět za následek tlumení hodnoty zeta potenciálu, jehož hodnota se v prostředí 0,15M NaCl více blíží nule. V prostředí 0,15M NaCl se roztok nachází na hranici stability. Naopak je tomu v prostředí deionizované vody, kde se o stabilní disperzní systém jedná, protože hodnoty naměřeného zeta potenciálu leží výrazně mimo interval -30 mV až $+30 \text{ mV}$.

5.2 Studium tvorby polyelektrolytových komplexů

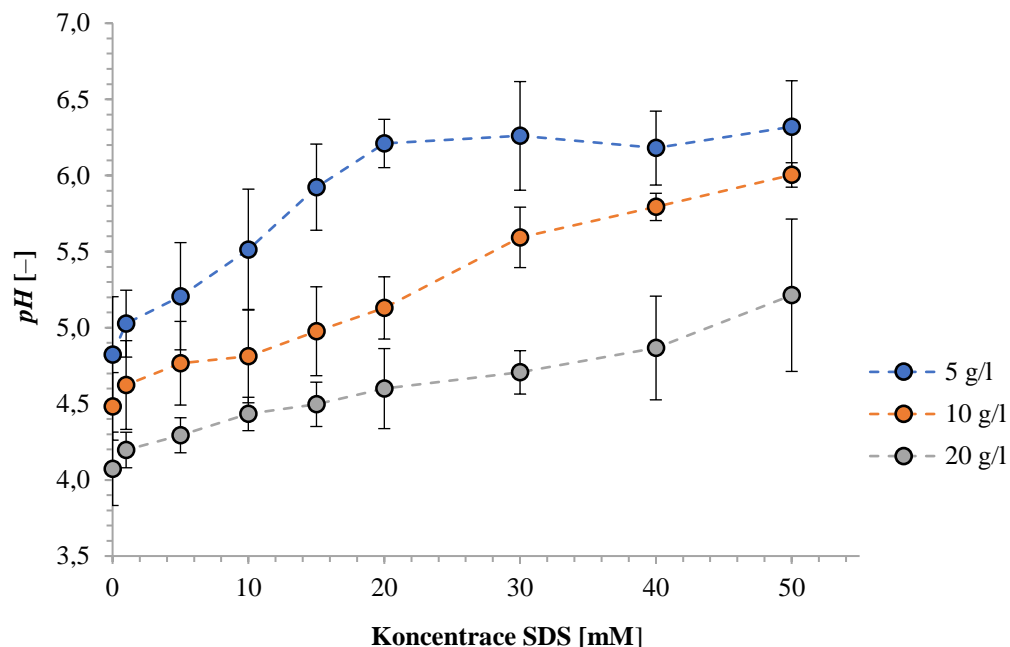
Cílem této hlavní experimentální části bakalářské práce bylo studium tvorby polyelektrolytového komplexu mezi DEAE-dextran hydrochloridem a SDS. Tvorba PE komplexu mezi oběma zmíněnými komponentami představuje iniciační krok při následné tvorbě hydrogelu. Právě hydrogel na bázi tohoto systému reprezentuje materiál s vysokým aplikačním potenciálem zejména v medicíně ve formě hydrogelového nosičového systému pro další aktivní látky. Pro účely charakterizace tvorby PE komplexu mezi oběma zmíněnými komponentami byla v rámci této bakalářské práce zvolena kombinace potenciometrie, konduktometrie a technik rozptylu světla (dynamický a elektroforetický rozptyl světla).

5.2.1 Potenciometrie a konduktometrie

První sledovanou charakteristikou byla závislost změny pH DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci použitého tenzidu – dodecylsulfátu sodném (dále jen SDS). Měření bylo provedeno v prostředí deionizované vody a v prostředí 0,15M NaCl. Naměřené hodnoty pH DEAE-dextran hydrochloridu v jednotlivých prostředích jsou uvedeny na Obr. 8 a Obr. 9.



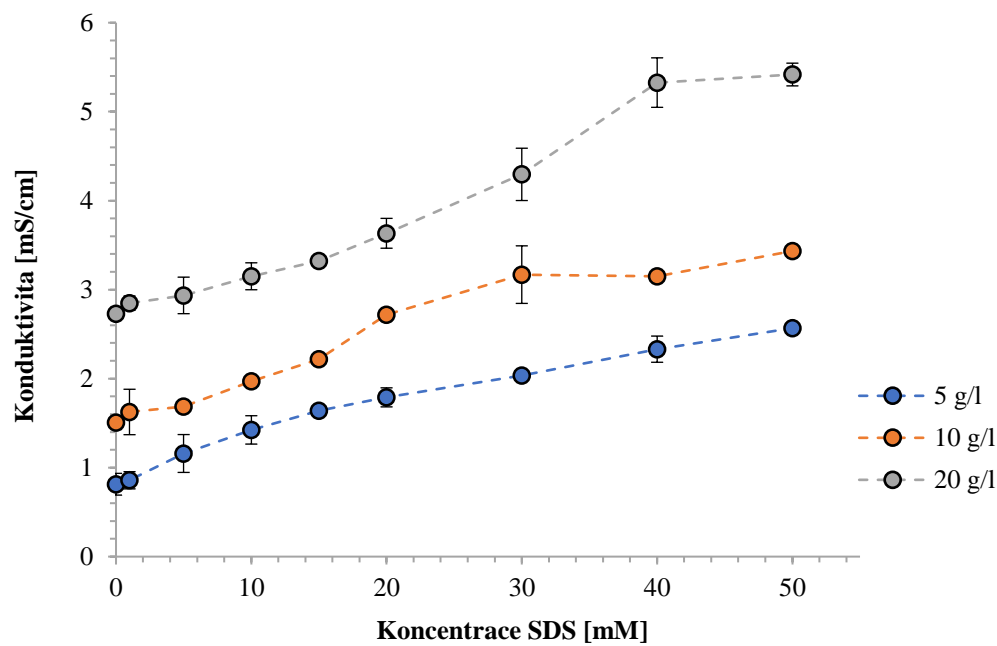
Obr. 8 – Závislost pH DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí DV



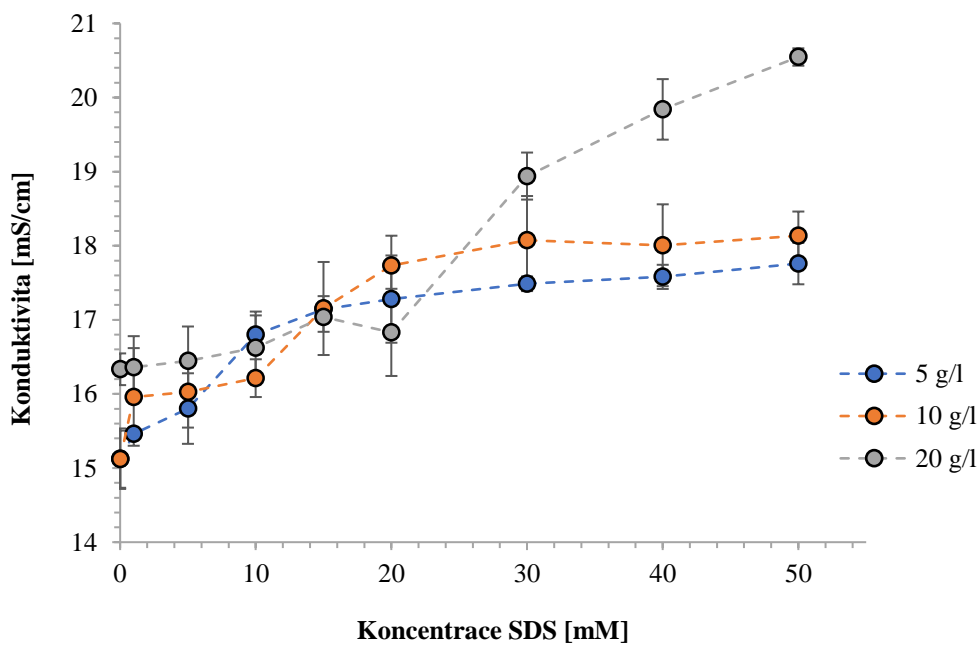
Obr. 9 – Závislost pH DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí 0,15M NaCl

V obou použitých prostředích s přibývající koncentrací SDS, pH jednotlivých roztoků pozvolna roste. Roztok dodecylsulfátu sodného má totiž vyšší hodnotu pH než jednotlivé roztoky dextranu v obou výchozích rozpouštědlech (DV a 0,15M NaCl). S přibývající koncentrací zásaditého tenzidu tak postupně dochází k nárůstu hodnoty pH. V obou studovaných prostředích (zejména u křivky pro koncentraci DEAE-dextran hydrochloridu o koncentraci 5 g/l) je viditelný zlom, který naznačuje ustálení interakcí v systému, a proto se zde pH již nemění.

Dalším studovaným jevem bylo měření závislosti konduktivity roztoků polymeru v závislosti na zvyšující se koncentrací tenzidu (SDS). Měření bylo opět provedeno jak v prostředí deionizované vody, tak v prostředí 0,15M NaCl. Výsledky měření konduktivity studovaných roztoků DEAE-dextran hydrochloridu jsou uvedeny na Obr. 10 a Obr. 11.



Obr. 10 – Závislost konduktivity DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí DV

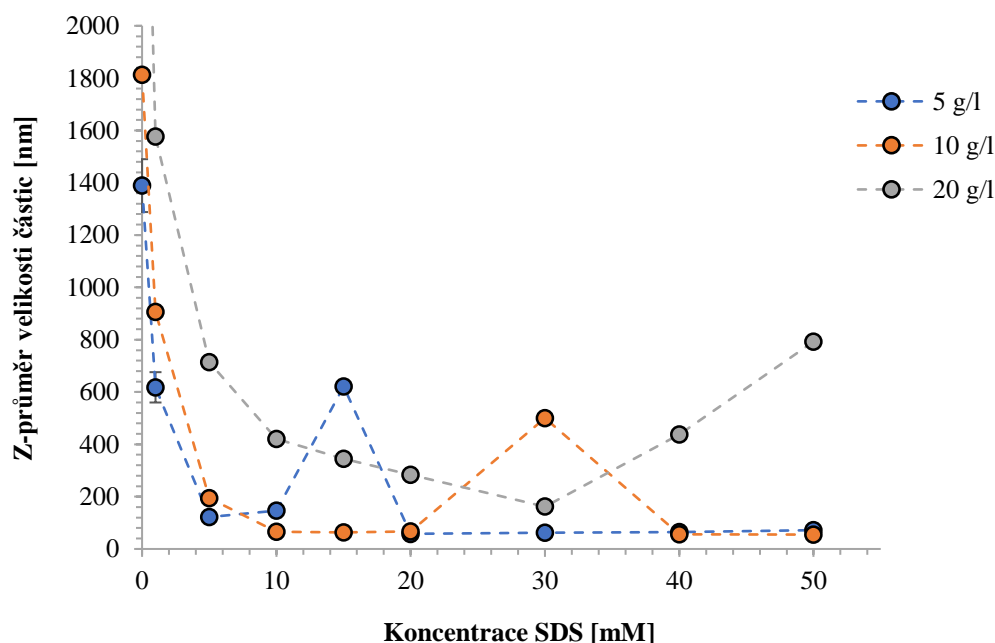


Obr. 11 – Závislost konduktivity DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí 0,15M NaCl

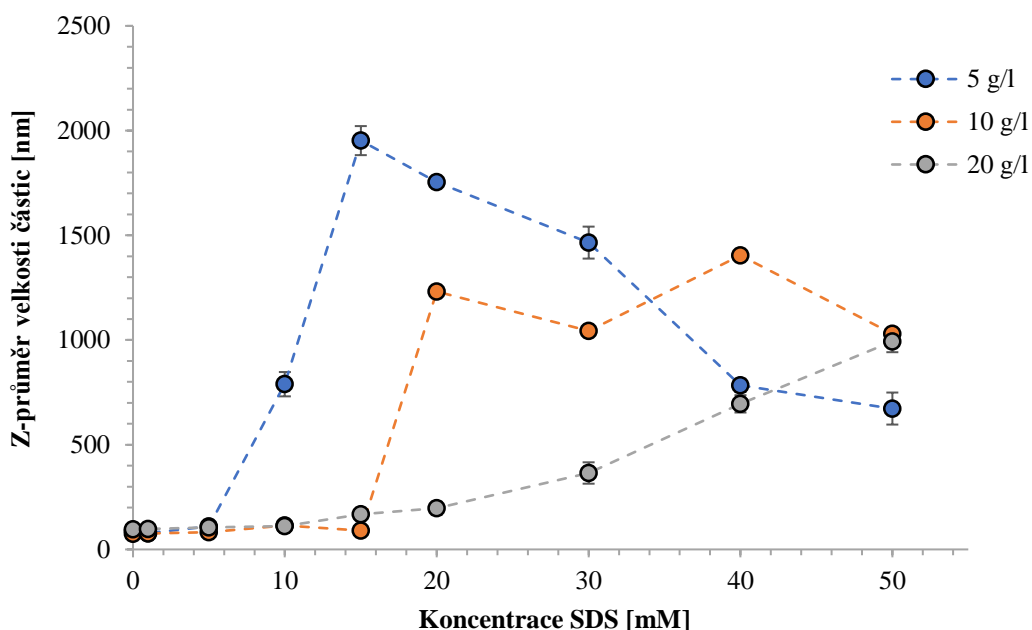
Hodnota konduktivity roztoku polymeru se zvyšující se koncentrací SDS postupně narůstá. K růstu dochází jak v prostředí deionizované vody, tak v prostředí 0,15M NaCl. Při porovnání obou prostředí je zřejmé, že vyšší hodnoty konduktivit nabývají roztoky v prostředí 0,15M NaCl. Přidaná sůl (s tím související vyšší iontová síla) má vliv na vodivost roztoku. V roztoku s NaCl je obsaženo více částic, které jsou schopny vést lépe elektrický proud, což se projeví vyššími hodnotami konduktivity. V obou studovaných prostředích (zejm. u křivek DEAE-dextran hydrochloridu o koncentraci 10 g/l) je viditelné zmírnění rychlosti růstu konduktivity. Tento fakt nasvědčuje tomu, že po dosažení kritické agregační koncentrace systému již nedochází k tak intenzivní tvorbě interakcí mezi komponentami.

5.2.2 Dynamický rozptyl světla

Interakce a tvorba PE komplexu v systému DEAE-dextran hydrochloridu a SDS je doprovázena tvorbou částic o větších velikostech a následně rovněž tvorbou sraženiny. Tento děj je možné charakterizovat využitím technik rozptylu světla. První z nich – dynamický rozptyl světla – byl v rámci této bakalářské práce využit pro charakterizaci změn v distribuci velikosti částic ve studovaných vzorcích během tvorby samotného PE komplexu. Opět jako již v předchozích případech bylo měření provedeno v prostředí deionizované vody a v prostředí 0,15M NaCl. Závislosti Z-průměru velikosti částic DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS jsou uvedeny na Obr. 12 a Obr. 13.



Obr. 12 – Závislost Z-průměru velikosti částic DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí DV



Obr. 13 – Závislost Z-průměru velikosti částic DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí 0,15M NaCl

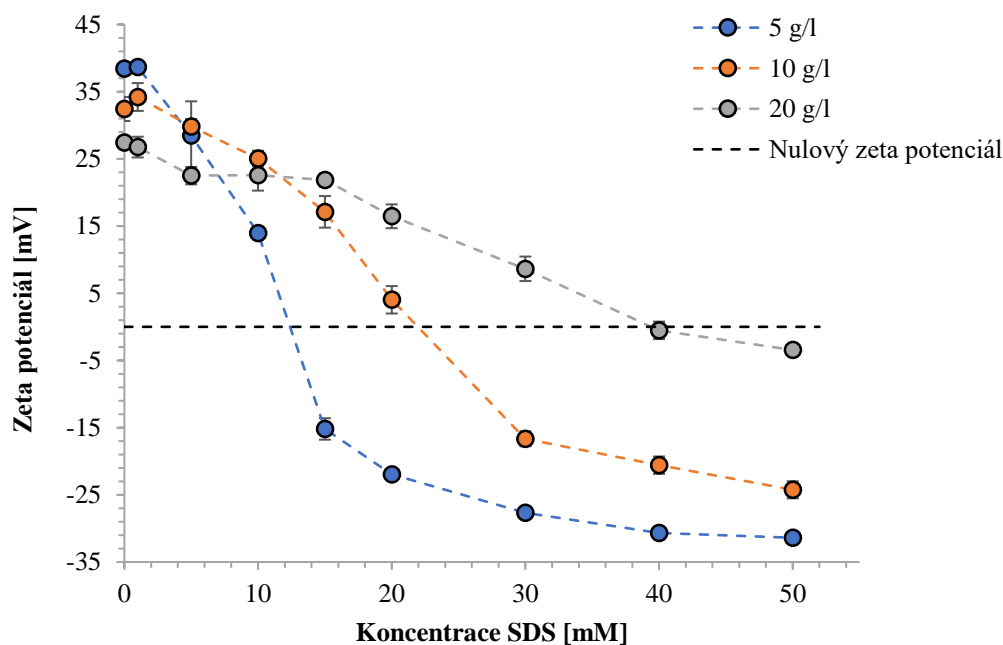
Trend této základní měřené charakteristiky se v jednotlivých prostředích liší. Na Obr. 12 je viditelný prvotní strmý pokles závislosti v oblasti minimální koncentrace tenzidu. V prostředí deionizované vody zaujímá modifikovaný dextran konformaci náhodně uspořádaných klubek. Tyto klubka nabývají mnohem větších velikostí než následně vznikající tužší koule, k jejichž vzniku přispěla zejména zvyšující se koncentrace použitého tenzidu, a taktéž zvýšená hodnota iontové síly v okolním prostředí. Z tohoto důvodu je tento proces doprovázen prvotním poklesem měřené hodnoty Z-průměru velikosti částic až do momentu, kdy začne docházet ke vzniku samotného PE komplexu, což je doprovázeno postupným nárůstem měřené hodnoty Z-průměru velikosti částic.

Tento proces byl rovněž pozorován vizuálně výrazným nárůstem viskozity vzorku v oblasti tvorby PE komplexu. Další přidavek SDS způsobil, že spolu jednotlivé částice přestaly tak aktivně interagovat, a proto k tak výrazným změnám ve velikostech již nedocházelo. Postupně naopak začalo docházet k rozpouštění vzniklého PE komplexu (což je zřejmé z poklesu velikosti částic na Obr. 12 i Obr. 13). Pouhým vizuálním pozorováním vzorku bylo vidět, že s postupně rostoucí koncentrací tenzidu celková viskozita studovaných vzorků klesala.

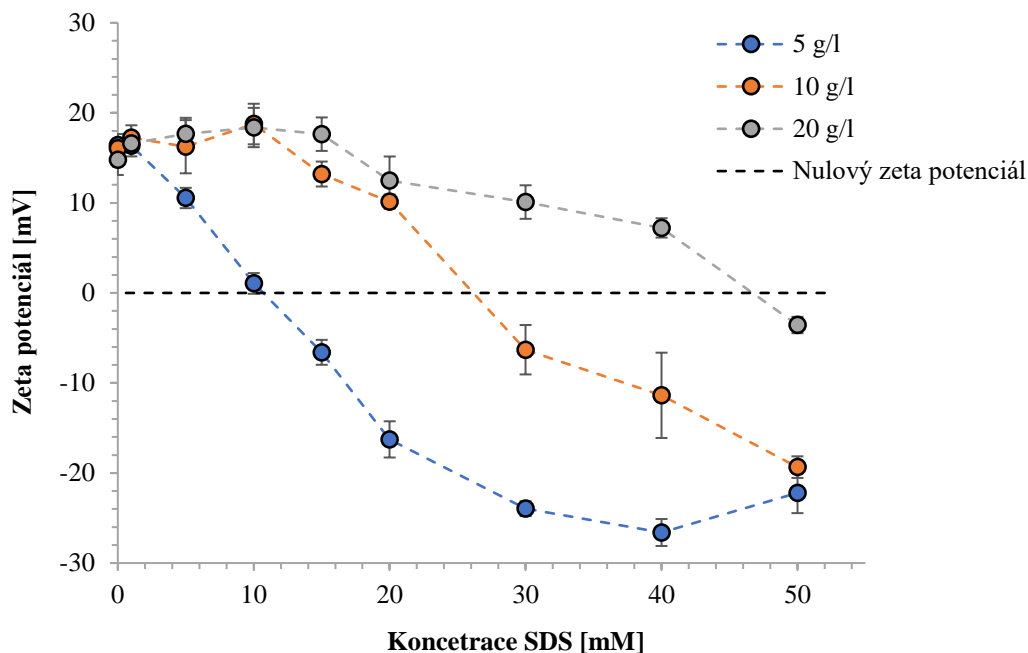
Dle Obr. 13 (v prostředí 0,15M NaCl) je evidentní, že k prvotnímu poklesu ve velikosti částic nedocházelo. Přídavek soli totiž značně ovlivňuje celkovou agregaci systému (resp. zvýšená iontová síla podporuje tvorbu a vznik PE komplexu). Ionty přítomné v roztoku soli jsou zodpovědné za téměř okamžité odstínění náboje na funkčních skupinách modifikovaného dextranu, čímž způsobují snížení hodnoty zeta potenciálu a jednotlivé částice tak spolu mohou lépe, a tudíž rychleji interagovat. Následný růst ve velikostech částic tak pokračoval až do dosažení kritické agregační koncentrace použitého SDS. Po dosažení této kritické agregační koncentrace byl ve studovaném systému (dle Obr. 13) pozorován značný pokles hodnoty Z-průměru velikosti částic. Taktéž vizuálním pozorováním byla patrná změna (resp. pokles) viskozity vzorku a bylo evidentní, že po dosažení agregační koncentrace systému, docházelo k následnému rozpouštění vzniklého PE komplexu.

5.2.3 Elektroforetický rozptyl světla

Vzájemné interakce v systému DEAE-dextran hydrochloridu s rostoucím množstvím SDS jsou doprovázeny tvorbou větších částic a následně sraženin. Tento proces souvisí s interakcí opačně nabitých látek, které je možné charakterizovat další technikou rozptylu světla – elektroforetickým rozptylem světla. Elektroforetický rozptyl světla byl v rámci této bakalářské práce zvolen pro měření hodnot zeta potenciálů ve studovaných vzorcích během tvorby PE komplexu. Stejně jako tomu bylo i v předešlých případech, bylo i tohle měření provedeno v prostředí deionizované vody a v prostředí 0,15M NaCl. Jednotlivé závislosti zeta potenciálů DEAE-dextran hydrochloridu na přibývající koncentraci SDS jsou uvedeny na Obr. 14 a Obr. 15.



Obr. 14 – Závislost zeta potenciálu DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí DV



Obr. 15 – Závislost zeta potenciálu DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí 0,15M NaCl

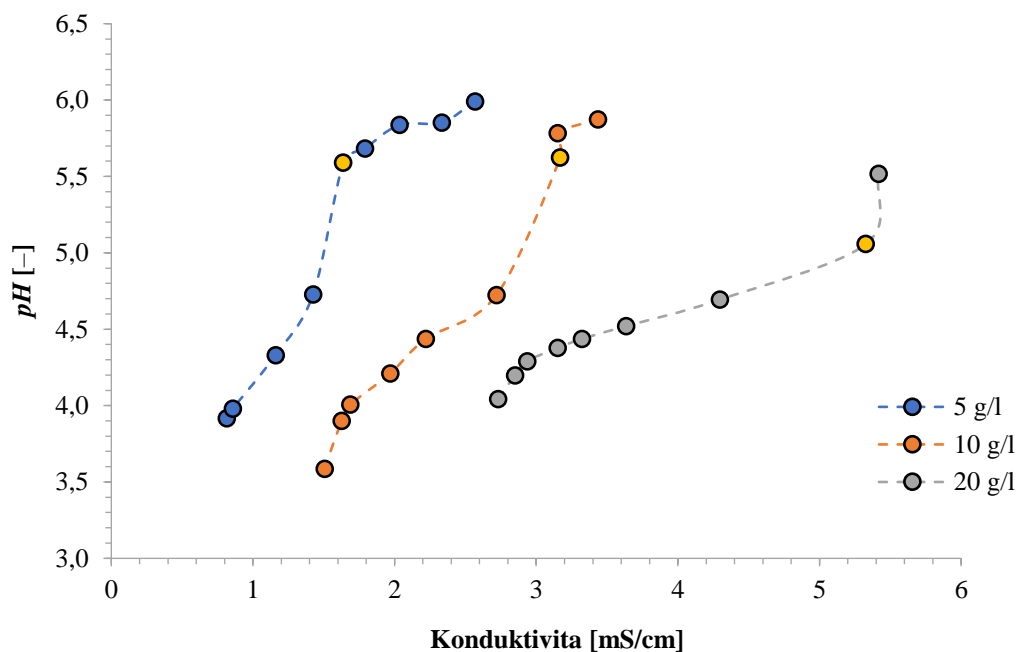
Na Obr. 14 i Obr. 15 vidíme, že s přibývajícím koncentrací tenzidu, hodnoty zeta potenciálu postupně klesají. Dochází k tomu, že se molekuly kladně nabitého DEAE-dextran hydrochloridu začnou postupně obalovat záporně nabitým tenzidem, což způsobuje pokles hodnot zeta potenciálu směrem k nulové hodnotě. V tomto případě je vzorek nejméně stabilní vůči agregaci jednotlivých částic. Další přidavek SDS již způsobuje postupný pokles hodnot zeta potenciálu do záporných hodnot, a s tím související postupný nárůst stability systému.

Při porovnání obou prostředí je zřejmé, že v přítomnosti deionizované vody nabývají hodnoty zeta potenciálu z počátku vyšších hodnot, než je tomu v prostředí s NaCl. Zvýšení iontové síly v systému má tudíž za následek snížení hodnot zeta potenciálu. Je také evidentní, že trend zde již není tak jednoznačný. V prostředí NaCl docházelo k rychlejší tvorbě interakcí a hodnota zeta potenciálu se tak v prostředí NaCl držela delší dobu v konstantních hodnotách. Teprve až s vyššími přídávky SDS se začaly hodnoty zeta potenciálu přibližovat více k nule. Každopádně koncentrace přídávky SDS, při kterých bylo v obou prostředích dosaženo nulového zeta potenciálu systému, jsou pro vzorky připravené jak ve vodě, tak v 0,15M NaCl srovnatelné.

Zvýšení hodnoty iontové síly usnadňuje průběh vzájemných interakcí v systému tím způsobem, že snižuje jejich odpudivé síly, a tím dochází k destabilizaci celkového systému. V důsledku toho lze tedy říci, že přidavek (resp. zvýšení) iontové síly podporuje tvorbu a vznik PE komplexu.

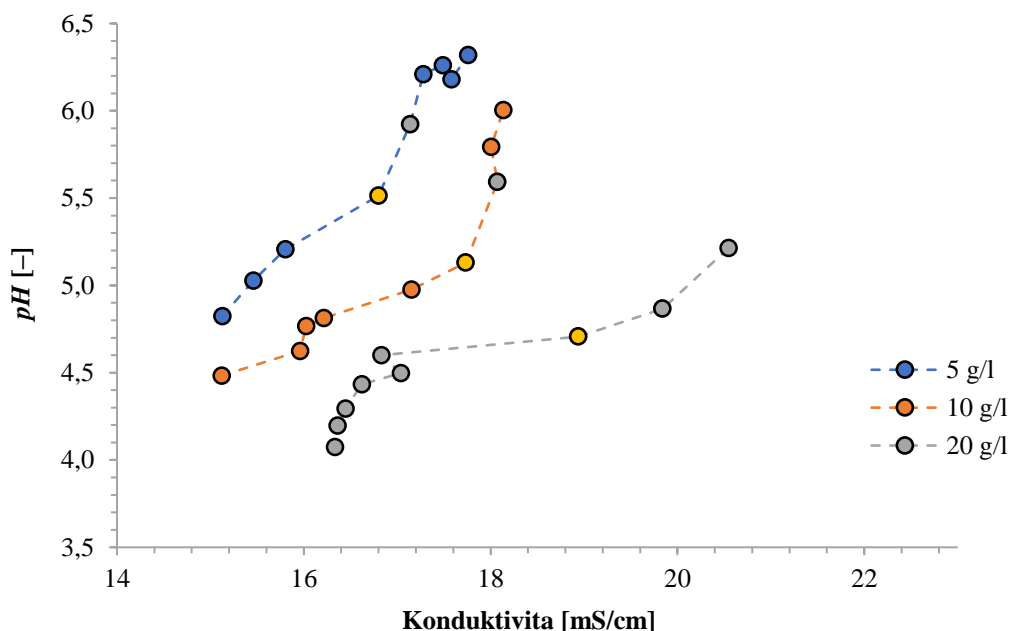
5.3 Korelace výsledků z jednotlivých metod

V této kapitole budou korelovány trendy získané z jednotlivých použitých metod. Nejprve budou porovnány výsledky z potenciometrie vs. konduktometrie. Jednotlivé výsledky měření v prostředí deionizované vody a v prostředí 0,15M NaCl jsou uvedeny na Obr. 16 a Obr. 17.



Obr. 16 – Porovnání změn v závislostech pH na konduktivě pro jednotlivé řady DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí DV (barevně označeny body, kdy došlo k agregaci)

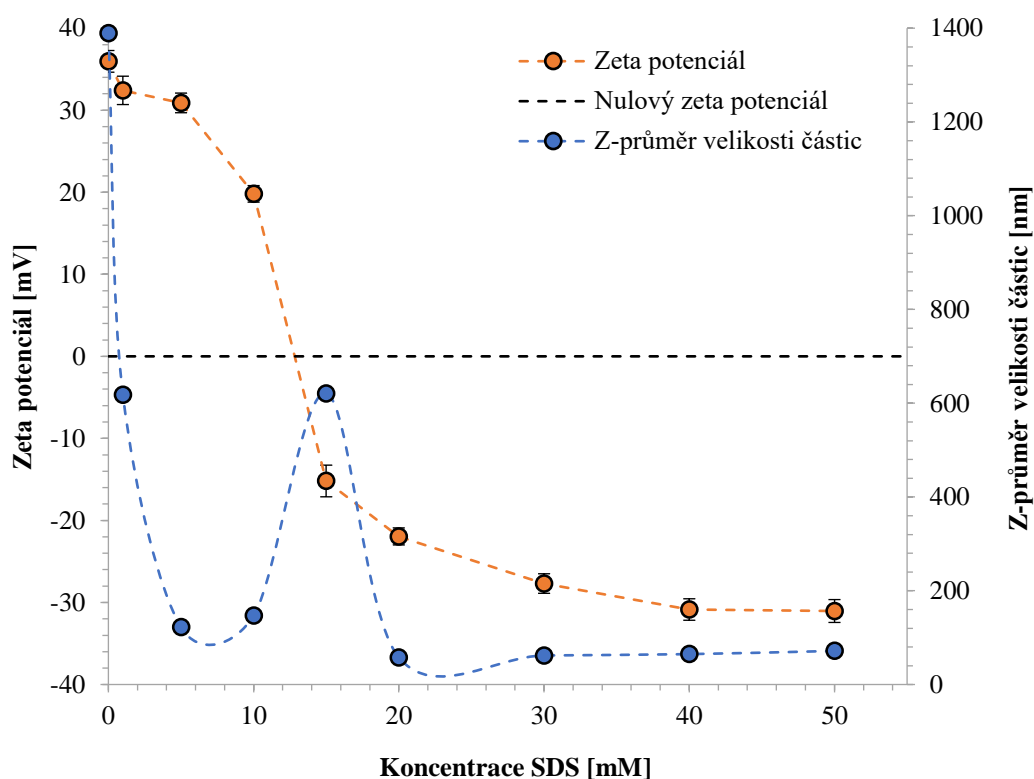
Na Obr. 16 a Obr. 17 jsou zobrazeny hodnoty pH jednotlivých koncentračních řad DEAE-dextran hydrochloridu v závislosti na konduktivitách těchto roztoků. Při porovnání obou prostředí je zřejmé, že při tvorbě PE komplexu dochází k postupnému růstu jak hodnot pH, tak k růstu hodnotám konduktivit. V obou prostředích lze pozorovat obdobný trend. Hodnoty pH se po dosažení agregací koncentrace systému skokem mění. Po agregaci se již hodnoty pH v systému prakticky nemění.



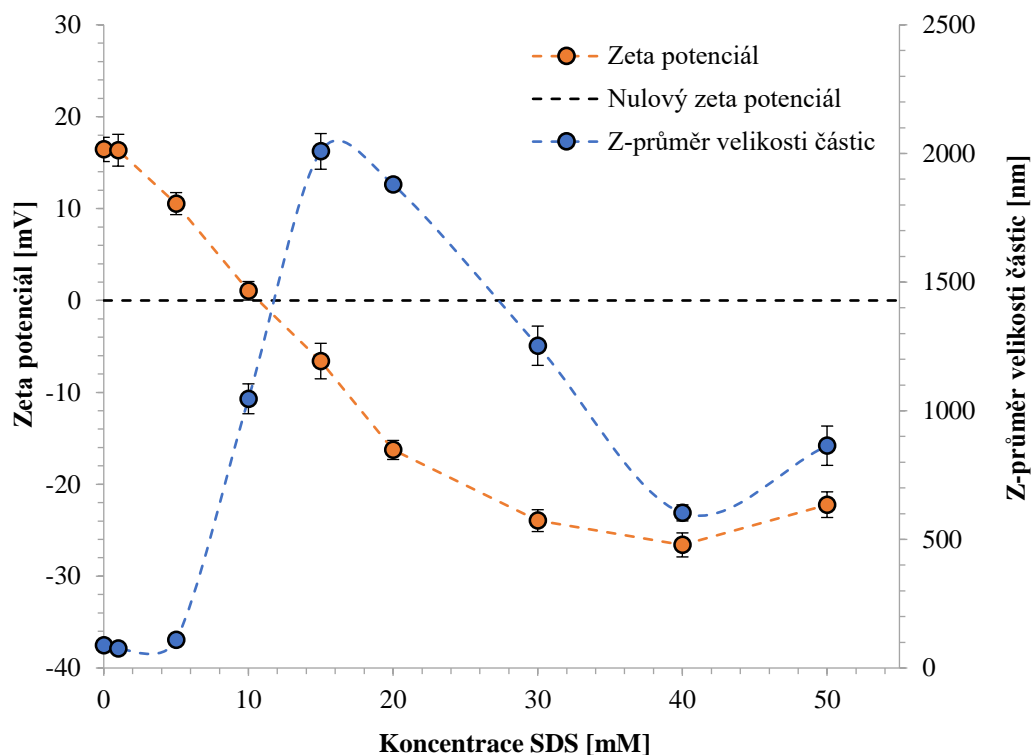
Obr. 17 – Porovnání změn v závislostech pH na konduktivitě pro jednotlivé řady DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí 0,15M NaCl (barevně označeny body, kdy došlo k agregaci)

Co se týče hodnot konduktivit, lze u nich pozorovat částečně podobný trend. Po vytvoření PE komplexu je v obou prostředích vidět částečný vzrůst v jejich hodnotách. Hodnoty konduktivit nejvíce ovlivňují ionty použitého elektrolytu, který je díky svým částicím schopen vést mnohem lépe elektrický proud. Proto hodnoty konduktivit v prostředí NaCl nabývají mnohem vyšších hodnot, než je tomu v prostředí deionizované vody. Za následný růst hodnot konduktivit roztoků, po dosažení kritické agregační koncentrace systému, může zejména přibývajícím množství anionaktivního tenzidu SDS.

Dále budou korelovány výsledky z měření velikosti zeta potenciálu a Z-průměru velikosti částic jednotlivých koncentračních řad DEAE-dextran hydrochloridu v závislosti na koncentraci použitého tenzidu – dodecylsulfátu sodném. Na Obr. 18 a Obr. 19 jsou zobrazena vzorová data pro koncentraci DEAE-dextran hydrochlorid 5 g/l jak v prostředí deionizované vody, tak v prostředí 0,15M NaCl (zbývající koncentrace viz. Přílohy).



Obr. 18 – Závislost zeta potenciálu a Z-průměru velikosti částic 5 g/l DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí DV



Obr. 19 – Závislost zeta potenciálu a Z-průměru velikosti částic 5 g/l DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí 0,15M NaCl

Z obou prostředí je zřejmé, že přechod hodnoty zeta potenciálu přes jeho nulovou hodnotu je doprovázen celkovou agregací systému polyelektrolyt-tenzid. Po dosažení agregační koncentrace systému dochází ke skokovému nárůstu v hodnotách Z-průměru velikostech částic. Je evidentní, že s dalším přidávkem tenzidu se hodnota zeta potenciálu postupně snižuje jak v prostředí deionizované vody, tak i v prostředí 0,15M NaCl. S postupně přibývajícím koncentrací použitého anionaktivního tenzidu dochází k tomu, že většina molekul opačně nabitého polymeru interaguje právě s tímto záporně nabitým tenzidem, a proto mají tyto interakce za následek záporné hodnoty zeta potenciálu.

Při vyšších hodnotách koncentrací tenzidu, pak docházelo k postupnému rozpouštění studovaného PE komplexu, což Obr. 18 i Obr. 19 potvrzují. Při rozpouštění docházelo k rapidnímu poklesu hodnot Z-průměru velikostí částic. Pro ostatní použité koncentrace DEAE-dextran hydrochloridu byl získán obdobný trend závislostí (viz. Přílohy).

Tab. 5 – Kritické agregační koncentrace (CAC) SDS ve studovaném systému

CDEAE-dextran hydrochlorid [mM]	CAC _{SDS} [mM]	
	V prostředí DV	V prostředí 0,15M NaCl
5	15	10
10	30	20
20	40	30

V Tab. 5 jsou uvedeny stanovené kritické agregační koncentrace použitého anionaktivního tenzidu SDS. Tyto hodnoty byly určeny ze skokové změny v měřených velikostech částic získaných z metody DLS (viz. Obr. 12 a Obr. 13). Při dosažení těchto koncentrací dochází v systému k agregaci. Jedná se tudíž o optimální přídavek tenzidu, kdy spolu jednotlivé komponenty agregují a vzniká tak kompaktnější gel.

Z Tab. 5 je patrné, že hodnoty CAC tenzidu SDS nabývají v prostředí 0,15M NaCl nižších hodnot, než je tomu v prostředí DV. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že nízkomolekulární ionty použitého elektrolytu (resp. zvýšená hodnota iontové síly v systému) přispívá ke tvorbě a vzniku PE komplexů.

Znalost podmínek, zejména pak uvedených kritických agregačních koncentrací, při kterých dochází v systému k agregaci, je nezbytná pro budoucí cílenou přípravu hydrogelů. Tyto znalosti nám umožňují např. jednoduchými změnami posunout rovnováhu tvorby PE komplexů směrem k produktům (resp. výchozím látkám) a umožňují nám tak připravit hydrogely tzv. na míru pro danou aplikaci.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat přípravu a blíže charakterizovat poyelektrolytový komplex v systému biopolymer–tenzid. Studované PE komplexy byly připraveny z opačně nabitých komponent. Ze skupiny biopolymerů nesoucí částečně kladný náboj, byl jako zástupce vybrán DEAE-dextran hydrochlorid. Z řad opačně nabitých tenzidů byl vybrán anionaktivní tenzid, dodecylsulfát sodný. Veškerá měření byla provedena v roztoku deionizované vody a v prostředí chloridu sodného, který sloužil k simulaci fyziologického prostředí. V této bakalářské práci byly pro bližší charakterizaci systému zvoleny především metody rozptylu světla, zejména dynamický a elektroforetický rozptyl světla. Pro účely tvorby PE komplexů byl následně prozkoumán i vliv zvýšené hodnoty iontové síly ve studovaném systému.

Nejprve byla provedena charakterizace použitých materiálů v obou prostředích. Byla proměřena molekulová hmotnost studovaných materiálů, Z-průměr velikosti částic v jednotlivých prostředích, zeta potenciál, hodnota pH každého z roztoků a v neposlední řadě také konduktivita roztoků. Znalost všech výše uvedených veličin a jejich závislostí je pro další studium tvorby PE komplexů, zejména k jejich následnému využití v medicínských aplikacích klíčová.

Hlavní částí této bakalářské práce bylo studium tvorby a vzniku PE komplexu v tomto systému. Pro účely bližší charakterizace tvorby komplexu byly zvoleny kombinace metod, jako např. potenciometrie, konduktometrie, již zmíněný dynamický a elektroforetický rozptyl světla. Bylo zjištěno, že s přibývajícím koncentrací tenzidu, hlavně pak v přítomnosti elektrolytu, dochází k efektivnější tvorbě PE komplexu. Měření pomocí dynamického rozptylu světla nám umožnilo prozkoumat distribuci velikosti těchto částic. Bylo prokázáno, že s přidáním tenzidu velikosti částic rostou, a to až do dosažení kritické agregační koncentrace celkového systému. Měření pomocí metody elektroforetického rozptylu světla nám naopak umožnilo sledovat změny v hodnotách zeta potenciálů. Měření poukázala na trend, který měl obdobný charakter v obou studovaných prostředích. Hodnoty zeta potenciálů klesaly až do záporných hodnot, které byly způsobeny především zvyšující se koncentrací použitého anionaktivního tenzidu SDS. Bylo prokázáno, že přechod hodnoty zeta potenciálu přes jeho nulovou hodnotu, značilo dosažení kritické agregační koncentrace studovaného systému. Z výsledků všech provedených měření, byly následně korelovány trendy všech závislostí, a to hlavně s přihlédnutím na zvyšující se iontovou sílu v systému.

Hlavním přínosem této práce bylo mimo jiné zjištění přibližných hodnot kritických agregačních koncentrací studovaného systému, jejichž znalost je nezbytná pro další studia a aplikace. Vzhledem k příznivým vlastnostem obou studovaných materiálů a jejich biokompatibilitě, budou zřejmě tyto systémy i nadále zkoumány a využívány pro tvorbu hydrogelů, hlavně jakožto nosičových systémů v tkáňovém inženýrství, či v medicínských aplikacích.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KATCHALSKY, A. Polyelectrolytes and Their Biological Interactions. *Biophysical Journal*. 1964, 4(1), 9-41. DOI: 10.1016/S0006-3495(64)86924-1. ISSN 00063495.
- [2] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přepřac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [3] DOBRYNIN, A a M RUBINSTEIN. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science*. 2005, 30(11), 1049-1118. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2005.07.006. ISSN 00796700.
- [4] HANSSON, Per a Björn LINDMAN. Surfactant-polymer interactions. *Cosmetic Science and Technology*. Elsevier, 1996, 2017, 1(5), 604-613. DOI: 10.1016/S1359-0294(96)80098-7. ISBN 9780128020050. ISSN 13590294.
- [5] THÜNEMANN, Andreas F., Martin MÜLLER, Herbert DAUTZENBERG, Jean-François JOANNY a Hartmut LÖWEN. Polyelectrolyte Complexes. *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004, 4(1), 113-171. Advances in Polymer Science. DOI: 10.1007/b11350. ISBN 978-3-540-00556-8. ISSN 00063495.
- [6] DAUTZENBERG, H. *Polyelectrolytes: formation, characterization, and application*. 1. Cincinnati: Hanser/Gardner, c1994. ISBN 15-699-0127-9.
- [7] GUCHT, Jasper van der, Evan SPRUIJT, Marc LEMMERS, Martien A. COHEN STUART a Hartmut LÖWEN. Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, 361(2), 407-422. Advances in Polymer Science. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.05.080. ISBN 978-3-540-00556-8. ISSN 00219797.
- [8] NEELY, W. Brock, Evan SPRUIJT, Marc LEMMERS, Martien A. COHEN STUART a Hartmut LÖWEN. Dextran: Structure and Synthesis. *Journal of Colloid and Interface Science*. Berlin, Heidelberg: Elsevier, 1961, 1961, 361(2), 341-369. Advances in Carbohydrate Chemistry. DOI: 10.1016/S0096-5332(08)60191-5. ISBN 9780120072156. ISSN 00219797.
- [9] De BELDER, A. N. Dextran. Handbooks from Amersham Biosciences. Dostupné z: <http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/Protein%20purification%20handbooks/Don't%20move/18116612AA.pdf>.
- [10] Dextran. *Sigma-Aldrich: Merck* [online]. Germany, 2018 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/dextran.html>.
- [11] Physical Properties of Dextran. Pharmacosmos: Committed to Quality [online]. Denmark: Pharmacosmos, 2017 [cit. 2017-11-26]. Dostupné z: <https://www.dextran.com/about-dextran/dextran-chemistry/physical-properties>.

- [12] Dextran and Related Polysaccharides: Dextran. Sigma-Aldrich: Merck [online]. Germany, 2018 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/dextran-and-related.html>.
- [13] BEMILLER, J.N. DEXTRAN. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 2003, 2003, , 1772-1773. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00330-8. ISBN 9780122270550.
- [14] Tenzidy a detergenty dnes. In: Chemické listy [online]. 1999 [cit. 2018-03-14]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf.
- [15] Studium tvorby micel: 24.5.2012. In: ChemPoint: Vědci pro průmysl a praxi [online]. 2012 [cit. 2018-03-14]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/studium-tvorby-micel>.
- [16] Stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů (CMC) na základě měření závislosti povrchového napětí vodného roztoku tenzidu na koncentraci. [online]. In: 2014 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/PN.pdf?redirected>.
- [17] Dodecylsulfát sodný: Dodecyl sulfate sodium salt for synthesis. Merckmillipore [online]. Denmark: Merck, 2017 [cit. 2017-11-27]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Dodecyl-sulfate-sodium-salt,MDA_CHEM-822050?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cz%2F.
- [18] Detergenty. LabGuide [online]. 2014 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <http://labguide.cz/reagencie/detergenty/>.
- [19] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. /. Hoboken, NJ: Copyright, 2002. ISBN 04-714-9883-1.
- [20] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, 6(2), 105-121 [cit. 2017-11-27]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232.
- [21] MATYJASZEWSKI, K. a Martin. MÖLLER. *Polymer science: a comprehensive reference*. 2nd ed. /. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-044-4533-494.
- [22] H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*[online]. InTech, 2011 [cit. 2017-11-27]. DOI: 10.5772/24553. ISBN 978-953-307-268-5.
- [23] KVÍTEK, Libor. Metody studia koloidních soustav. In: *Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc* [online]. Olomouc: Prozatímní učební text 2006, 2006 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>.
- [24] DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA V ANALÝZE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ. *Chemické listy* [online]. 760 0, Zlín: Česká společnost chemická, 2013 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf.

- [25] Dynamic Light Scattering (DLS). *Malvern* [online]. United Kingdom: Copyright, 2017 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: <https://www.malvern.com/products/technology/dynamic-light-scattering>.
- [26] Electrophoretic Light Scattering (ELS). In: *Malvern* [online]. United Kingdom: Copyright, 2017 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: https://www.malvern.com/en/products/technology/electrophoretic-light-scattering/?gclid=Cj0KCQiAgZTRBRDmARIsAJvVWAuZkhhuJTUHiEQR_tJmdcSfSujK8Vx0sbo52bFwtDfOaz9hCx7oNqQaAhKLEALw_wcB.
- [27] Zetasizer Nano ZS. In: *Malvern* [online]. United Kingdom: Copyright, 2017 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: <https://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs>.
- [28] Zeta Potential. In: *Horiba scientific* [online]. United Kingdom: HORIBA, 2017 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/zeta-potential/>.
- [29] Zeta potenciál. In: *Xray* [online]. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/pojmy.htm>.
- [30] SEC-MALLS. In: *WYATT TECHNOLOGY* [online]. USA: Wyatt Technology Corporation, 2017 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: <https://www.wyatt.com/solutions/techniques/sec-mals-molar-mass-size-multi-angle-light-scattering.html>.
- [31] GIRIDHAR, Gurram, R.K.N.R. MANEPALLI a Gudimamilla APPARAO. Size-Exclusion Chromatography. *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*. Elsevier, 2017, , 51-65. DOI: 10.1016/B978-0-323-46139-9.00003-7. ISBN 9780323461399.
- [32] BAKRANIA, Anita K., Bhavesh C. VARIYA, Lalaji V. RATHOD a Snehal S. PATEL. DEAE-Dextran coated paclitaxel nanoparticles act as multifunctional nano system for intranuclear delivery to triple negative breast cancer through VEGF and NOTCH1 inhibition. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018, 122, 37-48. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.10.007. ISSN 09396411.
- [33] BAKRANIA, Anita K., Bhavesh C. VARIYA, Prem MADAN, Snehal S. PATEL a Marijan GOTIĆ. Repeated dose 28-day oral toxicity study of DEAE-Dextran in mice: An advancement in safety chemotherapeutics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017, 88(9), 262-272. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.07.005. ISSN 02732300.
- [34] ONISHI, Yasuhiko, Yuki ESHITA, Aya MURASHITA, Masaaki MIZUNO a Jun YOSHIDA. Characteristics of DEAE-dextran-MMA graft copolymer as a nonviral gene carrier: An advancement in safety chemotherapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2007, 3(3), 184-191. DOI: 10.1016/j.nano.2007.07.002. ISSN 15499634.

[35] DEY, J., N. SULTANA, S. KUMAR, V. K. ASWAL, S. CHOUDHURY a K. ISMAIL. Controlling the aggregation of sodium dodecylsulphate in aqueous poly(ethylene glycol) solutions: An advancement in safety chemotherapeutics. *RSC Advances*. 2015, **5**(91), 74744-74752. DOI: 10.1039/C5RA13096D. ISSN 2046-2069.

[36] USOL'TSEVA, N. V., A. I. SMIRNOVA, N. V. ZHARNIKOVA, M. S. KURBATOVA, N. I. GIRICHEVA a V. G. BADELIN. Effect of Glycine on Lyomesophase Formation by Sodium Dodecylsulfate – Water Systems. *Liquid Crystals and their Application*. 2016, 16(2), 70-79. DOI: 10.18083/LCAppl.2016.2.70. ISSN 19913966.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

Zkratka	Vysvětlení zkratky
CAC	kritická agregační koncentrace (critical aggregation concentration)
CMC	kritická micelární koncentrace (critical micelle concentration)
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
DV	deionizovaná voda (deionized water)
ELS	elektroforetický rozptyl světla (electrophoretic light scattering)
MALS	víceúhlý rozptyl světla (multiangle light scattering)
PE	polyelektrolyt (polyelectrolyte)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulphate)
SEC	velikostně vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography)

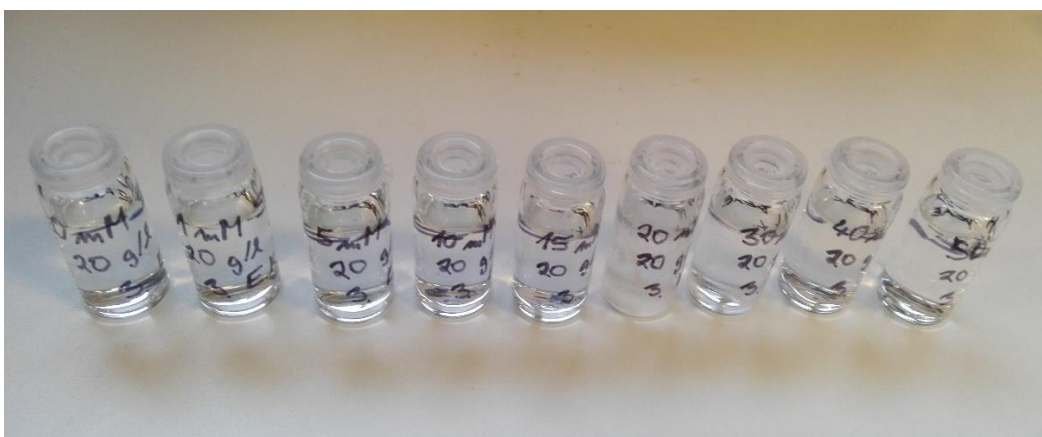
8.2 Seznam použitých symbolů

Symbol	Popis veličiny
c	koncentrace
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia
D	difúzní koeficient
Da	dalton
g	gram
I_0	intenzita dopadajícího světla
k_B	Boltzmannova konstanta
kDa	kilodalton
kg	kilogram
mV	milivolt
M_w	molekulová hmotnost
π	Ludolfovo číslo
η	viskozita disperzního prostředí
T	absolutní teplota
V	objem

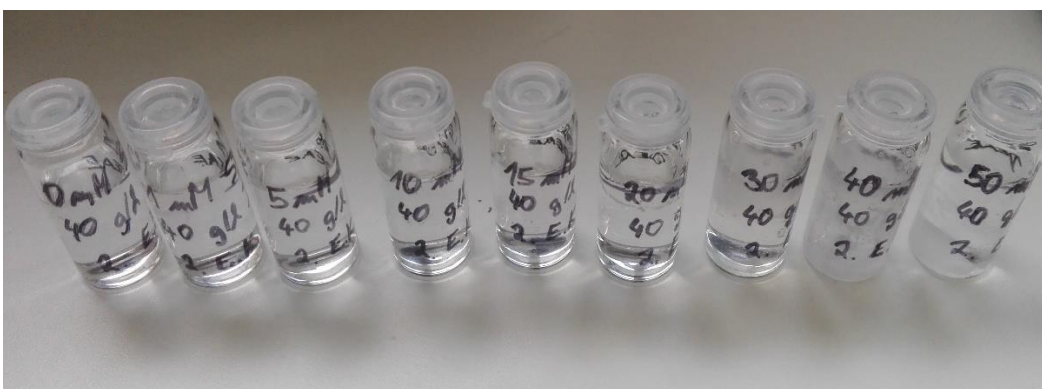
9 PŘÍLOHY



Příloha 1 – Koncentrační řada 5 g/l DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí DV



Příloha 2 – Koncentrační řada 10 g/l DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí DV



Příloha 3 – Koncentrační řada 20 g/l DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí DV



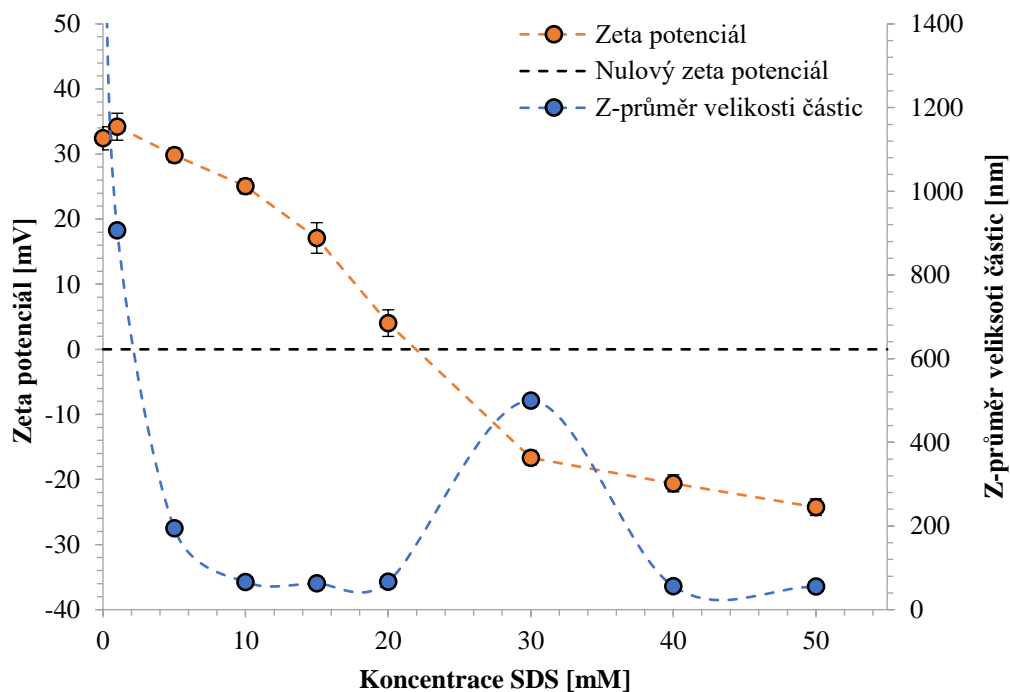
Příloha 4 – Koncentrační řada 5 g/l DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí 0,15M NaCl



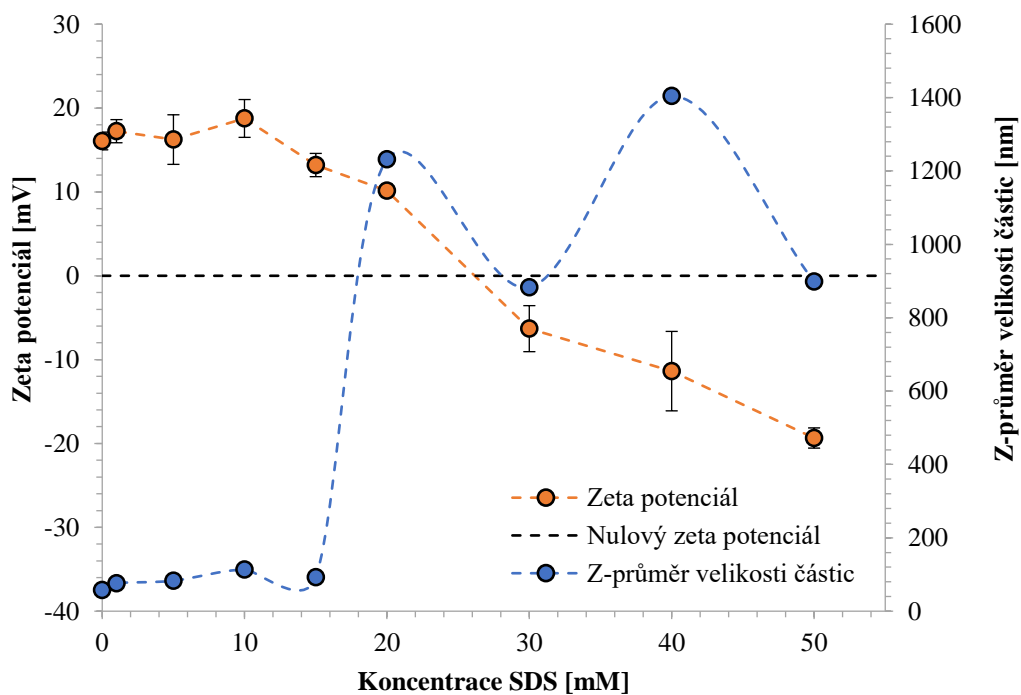
Příloha 5 – Koncentrační řada 10 g/l DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí 0,15M NaCl



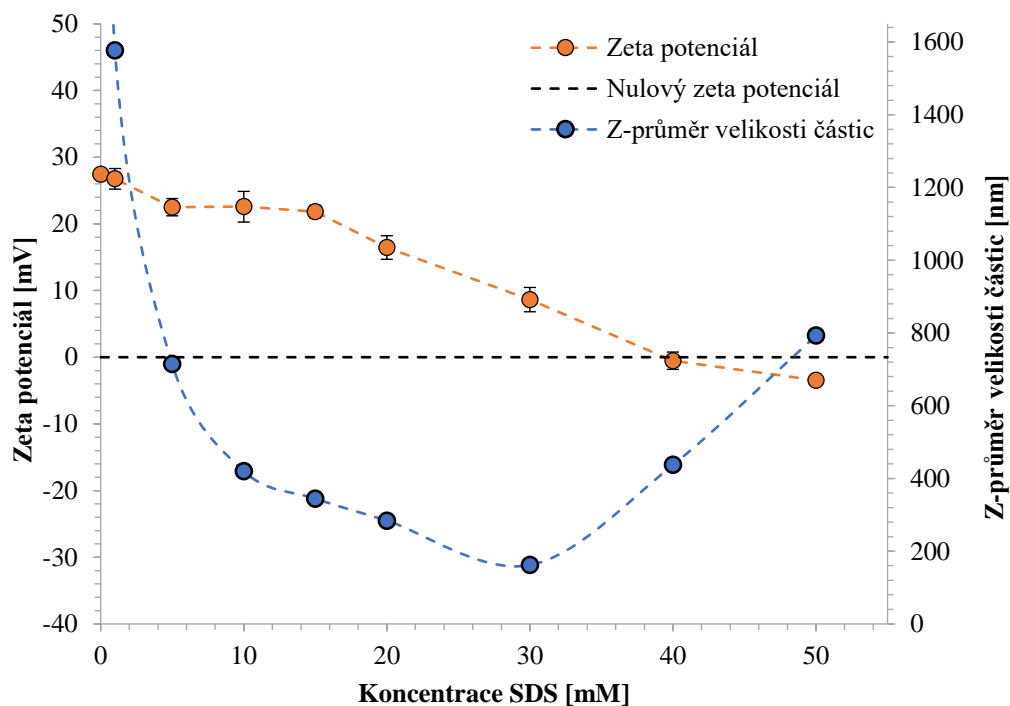
Příloha 6 – Koncentrační řada 20 g/l DEAE-dextran hydrochloridu v prostředí 0,15M NaCl



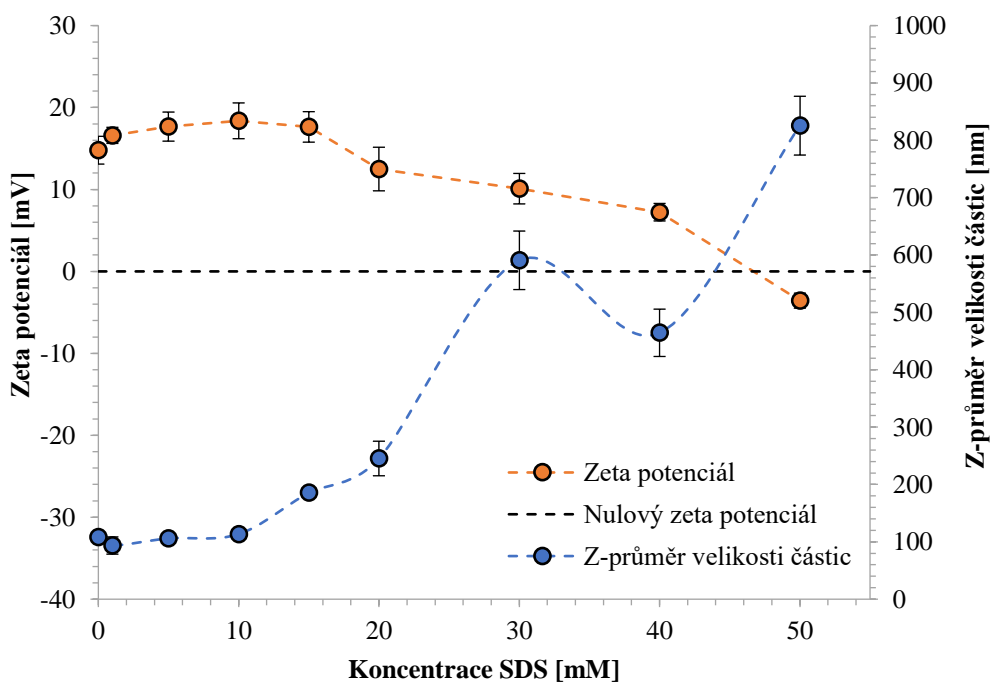
Příloha 7 – Závislost zeta potenciálu a Z-průměru velikosti částic 10 g/l DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí DV



Příloha 8 – Závislost zeta potenciálu a Z-průměru velikosti částic 10 g/l DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí 0,15M NaCl



Příloha 9 – Závislost zeta potenciálu a Z-průměru velikosti částic 20 g/l DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí DV



Příloha 10 – Závislost zeta potenciálu a Z-průměru velikosti částic 20 g/l DEAE-dextran hydrochloridu na koncentraci SDS v prostředí 0,15M NaCl